



Naturalis

Repositorio Institucional
<http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar>

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Naturales y Museo



Virus patógenos de Culícidos : diversidad, patología, transmisión y espectro hospedador

Muttis, Evangelina

Doctor en Ciencias Naturales

Dirección: Micieli, María Victoria

Co-dirección: García, Juan José

Facultad de Ciencias Naturales y Museo
2017

Acceso en:

<http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar/id/20171005001551>



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional



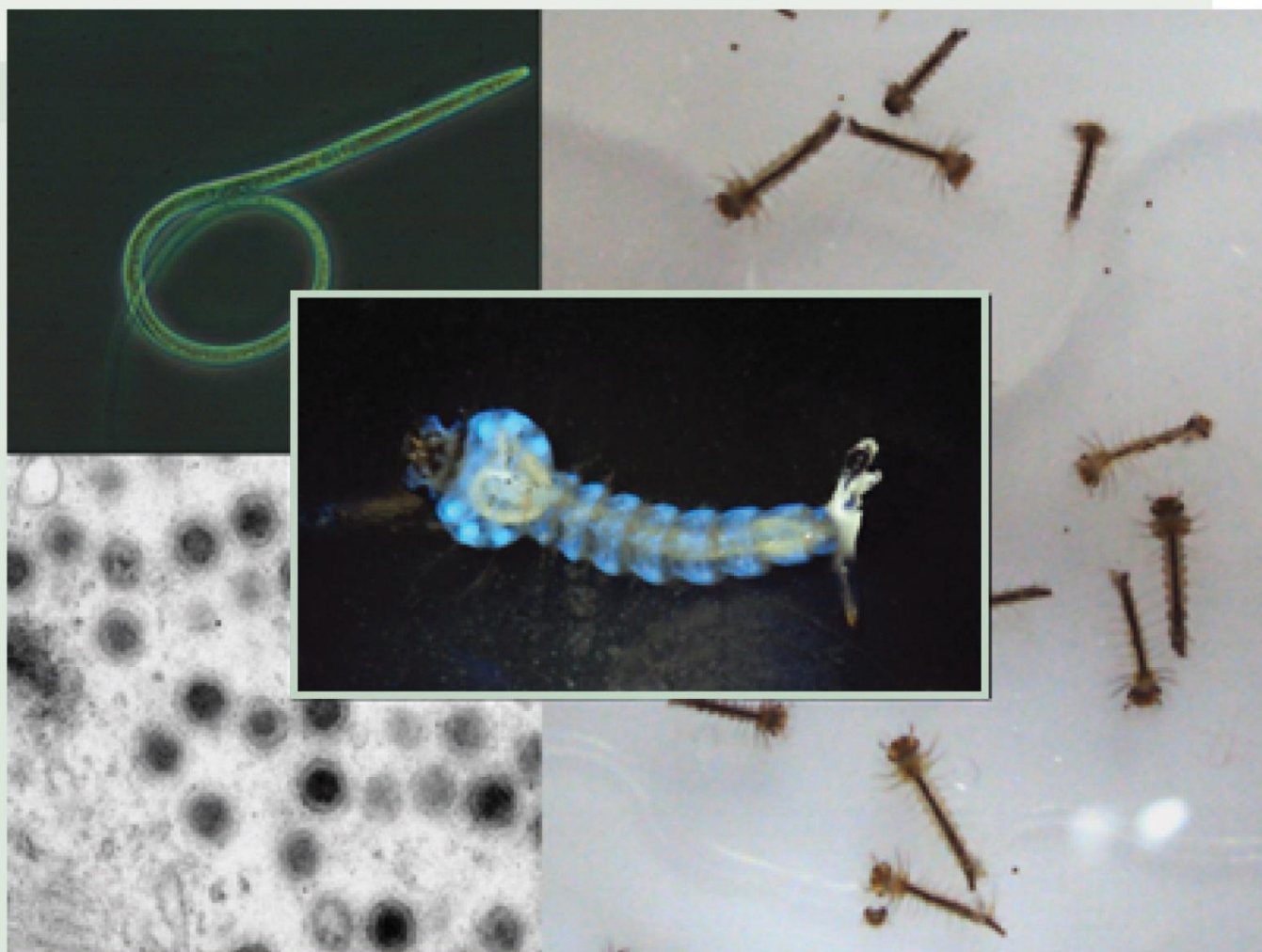
Naturalis

Repositorio Institucional
FCNyM - UNLP

Tesis Doctoral

**Virus patógenos de culícidos:
diversidad, patología, transmisión
y espectro hospedador.**

LIC. MUTTIS EVANGELINA
2017



DIRECTORES:
MICIELI, MARÍA VICTORIA
GARCÍA, JUAN JOSÉ

Agradecimientos

En principio quiero agradecer a todos los que estuvieron directamente involucrados en la realización de esta tesis. A mis directores, la Dra. María Victoria Micieli y el Dr. Juan José García, porque me dieron la oportunidad de desarrollar el presente estudio y por su compromiso y predisposición para resolver los inconvenientes que se presentaron, brindándome apoyo en todo momento. También quiero agradecer a la Universidad Nacional de La Plata, al CONICET y al CEPAVE, por ser las instituciones que participaron en mi formación, brindándome lugar físico, recurso económico y apoyo institucional.

Quiero agradecer a mis compañeros del CEPAVE que colaboraron con mi trabajo y me ayudaron de incontables formas: Alejandra, Romina, Gerardo, Gustavo, Claudia, Milagros, Manuel, Soledad, Agustín, Micaela, Laura y a todo el personal en general.

También agradezco la ayuda proveniente de personas pertenecientes a otras instituciones tanto del país como del exterior:

A los Dres. Pablo D. Ghiringhelli, Solange Miele y Mariano Belaich del Laboratorio de Ingeniería Genética y Biología Celular y Molecular de la Universidad Nacional de Quilmes, por su colaboración en el área de biología molecular.

Al Servicio de Microscopia Electrónica de la Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP, por la paciencia y buena predisposición en el procesamiento y visualización de las muestras.

Al Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE) por la realización de las pruebas en cultivo celular.

A Trevor Williams del Instituto de Ecología del Estado de Veracruz, México, por el aporte de su experiencia en la temática.

Al Dr. James Becnel, Neil Sanscrainte y William Reid por el diseño de primers y otras asistencias.

En el plano personal quiero agradecer a mis padres, María y Miguel por darme la oportunidad de estudiar, aun cuando la situación fue difícil. A mis suegros, Stella y Juan, por la ayuda diaria y desinteresada, por hacerme sentir como una hija y por su participación fundamental en la crianza de mis hijos. Por último los agradecimientos más especiales son para mi marido Cristian por brindarme su amor y ayuda

incondicional en todo momento y por ser un pilar esencial en el día a día; y para mis solcitos Morena y Facundo, por ser lo mejor de la vida y por demostrarme diariamente que siempre se puede dar mucho más de lo que creemos posible.

Muchas gracias a todos!!!!

Indice

Resumen	1
Abstract	4
Introducción General	8
La Familia Culicidae y su importancia sanitaria	8
Importancia sanitaria de la familia Culicidae en Argentina	9
Complejo <i>Culex pipiens</i>: biología, ecología y taxonomía.....	11
Características biológicas y ecológicas generales	11
Distribución y taxonomía	15
Control de culícidos en el mundo.	16
Conocimiento de los parásitos y patógenos de culícidos en el mundo.	17
Virus patógenos de culícidos	18
Familia <i>Baculoviridae</i>	19
Familia <i>Iridoviridae</i>	24
<u>Objetivos Generales y Específicos.....</u>	32
<u>Capítulo 1: Prospección de patógenos virales en poblaciones de culícidos de campo</u>	
Introducción	34
Descripción del área de estudio	34
Materiales y métodos.....	37
Metodología general	37
Materiales y métodos específicos para el Sitio 1	38
Materiales y métodos específicos para el Sitio 2	39
Resultados	43
Sitio 1.....	43
Sitio 2.....	45
Discusión	47
<u>Capítulo 2: Identificación de los virus hallados</u>	
Introducción	49

Materiales y métodos.....	50
Identificación por sintomatología.....	50
Identificación por observación directa con Microscopio Electrónico de Transmisión (MET).	50
Identificación Molecular del Iridovirus	51
Resultados	53
Identificación por sintomatología.....	53
<i>Baculoviridae</i>	53
<i>Iridoviridae</i>	53
Identificación por observación directa con Microscopio Electrónico de Transmisión (MET).	53
Identificación Molecular	55
Discusión.....	58
<u>Capítulo 3: Transmisión Horizontal del Iridovirus</u>	
Introducción.....	61
Materiales y métodos.....	62
Obtención de mosquitos y nematodos	62
Obtención de virus	62
Purificación y cálculo del equivalente larval.	62
Inóculo	65
Ensayos.....	65
1. Transmisión Per os	66
2. Transmisión por laceración de la cutícula y tubo digestivo	66
3. Transmisión mediada por el nematodo <i>Strelkovimermis spiculatus</i>	68
Resultados	70
Cuantificación viral y equivalente larval	70
Ensayos.....	70
1. Transmisión <i>per os</i>	70
2. Transmisión por laceración de la cutícula y el tubo digestivo	71
3. Transmisión mediada por el nematodo	71
Discusión.....	76
<u>Capítulo 4: Interacción Nematodo- Iridovirus- Mosquito</u>	
Introducción	80

Materiales y Métodos.....	82
Susceptibilidad de <i>Strelkovimermis spiculatus</i> al iridovirus	82
Etapa pre- parásita.....	82
Etapa parásita	83
Etapa pos-parásita	83
Múltiple parasitismo e infección con MIV	83
Resultados	85
Susceptibilidad de <i>Strelkovimermis spiculatus</i> al iridovirus	85
Etapa pre- parásita.....	85
Etapa parásita	87
Etapa pos-parásita	87
Múltiple parasitismo e infección con MIV	88
Discusión	89
<u>Capítulo 5: Patología producida por el iridovirus en larvas de <i>Culex pipiens</i></u>	
Introducción	92
Materiales y Métodos.....	95
Patología general.....	95
Observaciones de campo	95
Observaciones en Laboratorio	95
Cito e histopatología	95
Resultados	96
Patología general.....	96
Progresión de la infección evidente.....	96
Observaciones de campo	99
Observaciones en Laboratorio	100
Discusión.....	105
<u>Capítulo 6: Persistencia del Iridovirus de <i>Culex pipiens</i> en semicampo y laboratorio</u>	
Introducción	108
Materiales y Métodos.....	110
Ensayo en laboratorio.....	110
Ensayo a semicampo	111

Resultados	112
Ensayo en laboratorio.....	112
Ensayo a semicampo	114
Discusión.....	115
<u>Capítulo 7: Estudios del Rango Hospedador del Iridovirus de <i>Culex pipiens</i></u>	
Introducción	119
Materiales y Métodos.....	122
Susceptibilidad de distintas especies de mosquito al iridovirus de <i>Culex pipiens</i>	122
<i>Culex apicinus</i>	122
<i>Ochlerotatus crinifer</i>	123
<i>Ochlerotatus albifasciatus</i>	123
<i>Aedes aegypti</i>	123
Susceptibilidad de células de <i>Aedes albopictus</i> al iridovirus de <i>Culex pipiens</i>	124
Protocolo de propagación viral en células de mosquito:	124
Detección del virus en las células de cultivo inoculadas.....	125
Prueba de virulencia del virus replicado en cultivo celular	125
Análisis de datos.....	126
Resultados	127
Susceptibilidad de distintas especies de mosquito al iridovirus de <i>Culex pipiens</i>	127
<i>Culex apicinus</i>	127
<i>Ochlerotatus crinifer</i>	128
<i>Ochlerotatus albifasciatus</i>	128
<i>Aedes aegypti</i>	129
Análisis de datos.....	132
Comparación de la proporción de larvas infectadas en las especies de mosquito <i>Aedes aegypti</i> y <i>Culex pipiens</i> en los diferentes tratamientos.....	132
Discusión.....	143
<u>Conclusiones</u>	<u>151</u>
Conclusión general y Perspectivas futuras.....	151
<u>Apendice 1 Cría y mantenimiento de mosquitos en cautiverio</u>	
Cría de <i>Culex pipiens</i>.....	153
Cría de <i>Aedes aegypti</i>.....	155

Apendice 2: Strelkovimermis spiculatus(Nematoda, Mermithidae): características de la especie Cría y mantenimiento en laboratorio

Características generales y Antecedentes	156
Ciclo de vida	156
<u>Abreviaturas</u>	162
<u>Publicaciones</u>	164
<u>Bibliografía citada</u>	165

Resumen

Virus patógenos de culícidos: diversidad, patología, transmisión y espectro hospedador

Es de público conocimiento la importancia cada vez mayor que tienen los mosquitos como vectores de enfermedades del hombre y de los animales domésticos, considerando que las enfermedades transmitidas por ellos representan más del 17% de todas las enfermedades infecciosas y provocan cada año, más de 1 millón de defunciones. Se hace evidente la necesidad de métodos de control de vectores más eficaces que los empleados hasta ahora. Un mayor conocimiento en este sentido, nos ayudará a evaluar nuevas perspectivas para el control de los mosquitos desde el punto de vista del Manejo Integrado.

Los insecticidas químicos han sido utilizados ampliamente para controlar a los culícidos y resultan eficaces en el corto plazo y en situaciones de brote epidémico, pero son poco efectivos en el mediano y largo plazo. Además, poseen baja o nula especificidad, producen desarrollo de resistencia en los insectos, deterioran el ambiente y la salud humana y son tóxicos para organismos no blanco. Por estos motivos, la tendencia mundial en cuanto al manejo de culícidos en el mundo es hacia el Control Bioracional, una estrategia que emplea el control biológico (patógenos, parásitos y depredadores naturales de los mosquitos) así como la utilización de químicos sintéticos que imitan sustancias naturales.

Se han citado como causantes de mortalidad en culícidos: virus, protozoos, hongos, nematodos y depredadores, aunque hasta el momento es insuficiente el conocimiento existente sobre la biología, la ecología, sus funciones reguladoras de las poblaciones y las interacciones de los mismos entre sí y con los insectos blanco. Los virus entomopatógenos son un grupo bien representado, con miembros incluidos en siete Familias. Los *Baculoviridae* (ADN) han sido los más profundamente estudiados y utilizados como agentes de control de insectos perjudiciales debido a las características especiales que poseen: elevada especificidad y resistencia en el

ambiente. Los registros en culícidos se limitan a la especie CuniNPV, hallado en larvas de *Culex nigripalpus* y *Culex quinquefasciatus* en Estados Unidos y otro aislamiento en *C. quinquefasciatus* en Brasil. La familia *Iridoviridae* (DNA), incluye un gran número de aislamientos tanto de vertebrados como de invertebrados. Los virus iridiscentes de invertebrados han sido estudiados por su posible rol como controlador biológico de especies importantes para la agricultura y la salud pública, aunque fue perdiendo interés debido a las bajas prevalencias y a un rango hospedador muy amplio. Posteriormente se descubrió una importante función reguladora de las poblaciones, dado que produce efectos subletales que afectan negativamente al tiempo de desarrollo y a la fecundidad, entre otros factores.

La presencia de un virus iridiscente en mosquitos fue reportada por primera vez en *Aedes (Ochlerotatus) taeniorhynchus*, posteriormente ha sido detectado en variedad de géneros. Para *Culex* solo hay dos reportes de un virus iridiscente infectando *Culex territans* de Rusia y Ucrania.

El objetivo general de la presente tesis fue contribuir al conocimiento de las patologías producidas por entomovirus en estados inmaduros de culícidos. Para tal fin, se realizó una búsqueda de virus en larvas de mosquitos dentro del área de estudio comprendida en las zonas suburbanas de las ciudades de Berisso, La Plata y Ensenada, Provincia de Buenos Aires, Argentina. Se logró identificar por primera vez en Argentina la presencia de un baculovirus que pertenecería al género *Deltabaculovirus* en una población del mosquito *Aedes (Ochlerotatus) crinifer* de Ensenada, Buenos Aires. También se logró identificar un virus de la familia *Iridoviridae* en una población del mosquito *Culex pipiens* en Berisso, Buenos Aires, Argentina. Se obtuvo la secuencia del gen de la proteína MCP y según el análisis filogenético de esta secuencia, el MIV de *C. pipiens* estaría cercano a la especie tipo del género *Chloriridovirus*. Estos registros constituyen el primero en Argentina de un baculovirus en larvas de mosquitos y el primer reporte mundial de un virus iridiscente en larvas de *C. pipiens* y de MIV en la región Neotropical. Debido a disponibilidad de material, solo fue posible profundizar sobre las características del iridovirus. El desarrollo de la presente tesis continuó con el estudio de los mecanismos de transmisión horizontal, la patología, la persistencia de las partículas virales en laboratorio y en semicampo y la especificidad de los entomovirus realizando estudios de rango hospedador.

La transmisión horizontal fue casi nula utilizando los mecanismos tradicionales mostrados en estudios anteriores. Solo se obtuvieron altas prevalencias al utilizar el nematodo *Strelkovimermis spiculatus* como transmisor, debido a la relación directa entre el parasitismo y la infección viral. Observaciones a nivel ultraestructural de las formas pre-parásitas del nematodo expuestas al MIV muestran acarreo de partículas virales sobre la cutícula; de esta manera, el parásito ingresaría el virus a la larva. Aun así, no se descarta una vía de entrada alternativa. Por otro lado, observaciones de campo y laboratorio, nos llevan a especular que los nematodos son susceptibles al virus en alguna etapa de su ciclo vital, pero no fue posible detectar focos de infección viral dentro de los nematodos en ninguna etapa del ciclo evaluada.

Para el mantenimiento de la infectividad de la partícula viral a largo plazo, resultó fundamental la presencia de un sustrato; pudiendo resistir, en presencia del mismo, hasta 9 semanas, sumergido, en oscuridad y a 25 °C. Mientras que con luz artificial se observó una caída de la prevalencia desde 64 a 8% en cuatro semanas. En ausencia de sustrato no se observó mantenimiento de la infectividad más allá de una semana.

Se concluyó que el virus introducido en un ambiente de cría natural de *C. pipiens* puede mantenerse infectivo por un tiempo muy prolongado. Esto es debido no solo a la persistencia de las partículas en el sustrato sino también a que la muerte de las larvas infectadas se da de manera asincrónica, posibilitando la perpetuación del inóculo en el ambiente. Además, las partículas virales contenidas en el cadáver permanecen protegidas y retienen la infectividad durante varios días. Mediante estudios de rango hospedador se comprobó la susceptibilidad de *Culex apicinus*, *Aedes (Stegomyia) aegypti* y *Aedes (Ochlerotatus) albifasciatus* a este virus, aunque la prevalencia viral resultó significativamente diferente entre especies, demostrando de esta manera la baja especificidad de este aislamiento.

Abstract

Entomopathogenic viruses of Culicidae: diversity, pathology, transmission and host range

The importance of mosquitoes as diseases vectors of human and domestic animals is increasing. The diseases transmitted by them account for more than 17% of all infectious disease and cause more than 1 million deaths per year around the world. Effective vector control methods are required. More specific knowledge in this area will help us evaluate new perspectives for mosquito control to be used in the framework of integrated management.

Chemical insecticides have been widely used for mosquito control and are effective in the short term and in epidemic outbreak situations, but are ineffective in the medium and long term. In addition, they do not have specificity, produce insect resistance and damage to the environment and human health, and are also toxic to non-target organisms. For these reasons the world trend in Culicidae management is towards Biorational Control, a strategy that uses biological control (pathogens, parasites and natural predators of the mosquito) as well as the use of synthetic chemicals that mimic natural substances.

Viruses, protozoa, fungi, nematodes and predators have been cited as causes of mortality in Culicidae, although the current knowledge about the biology, the ecology, their role as regulators of natural host populations and their interactions with each other is insufficient. Entomopathogenic viruses are a well-represented group, with members included in seven families. *Baculoviridae* (DNA) has been the most studied and used viruses as insect control agents because of the special characteristics they: high specificity and resistance in the environment.

The only species that has been found in mosquitoes to date is CuniNPV, found in *Culex nigripalpus* and *Culex quinquefasciatus* larvae in the United States of America and other isolate in *C. quinquefasciatus* in Brazil. The family *Iridoviridae* (DNA) includes a large number of isolates of both vertebrates and invertebrates. Iridescent invertebrate viruses have been studied for their possible role as biological control agents of

important insects for agriculture and public health, although it has been losing attention due to low prevalence and a very wide host range. Subsequently, an important function as regulator agents of natural populations was discovered, since it produces sub-lethal effects that negatively affect developmental time and fertility, among other factors.

The presence of an iridescent virus in mosquitoes was first reported in *Aedes (Ochlerotatus) taeniorhynchus*, and has subsequently been detected in several genera. For *Culex* there are only two reports of an iridescent virus infecting *Culex territans* of Russia and Ukraine.

The general objective of this project was to contribute to the knowledge of pathologies produced by entomoviruses in immature stages of mosquitoes. For this purpose, a virus sampling was carried out on mosquito larvae within the study area located in the suburban areas of the cities of Berisso, La Plata and Ensenada in the Province of Buenos Aires, Argentina.

It was possible to identify for the first time in Argentina the presence of a baculovirus that would belong to the genus *Deltabaculovirus* in a population of the mosquito *Aedes (Ochlerotatus) crinifer* of Ensenada, Buenos Aires. It was also possible to identify a virus of the family Iridoviridae in a population of the mosquito *Culex pipiens* in Berisso, Buenos Aires, Argentina.

The sequence of the Major Capsid Protein gene was obtained and according to the phylogenetic analysis, the iridescent virus of *C. pipiens* is phylogenetically close to the type species of the genus *Chloriridovirus*. These records constitute the first report in Argentina of a baculovirus in mosquito larvae and the first report of an iridescent virus in *C. pipiens* larvae around the world and the first mosquito iridescent virus in the Neotropical region.

Studies on mechanisms of horizontal transmission, pathology, persistence of the viral particles in the laboratory and semi-natural conditions of Iridovirus were carried out. Finally, the specificity of this isolate of entomovirus was evaluated through studies of mosquito host range.

The horizontal transmission was scarce when the traditional mechanisms shown in previous studies were used. High MIV prevalence in mosquito larvae were only

obtained when the nematode *Strelkovimermis spiculatus* was used as a vector, due to the direct relationship between nematode parasitism and viral infection.

Observations at the ultrastructural level of the pre-parasitic nematode exposed to the iridescent virus showed viral particles on the cuticle, site through which the parasite could introduce the virus into the larva hemocoel. Even so, an alternative route of particle entry is not ruled out. On the other hand, field and laboratory observations lead us to believe that nematodes are susceptible to the virus at some stage of their life cycle, but it was not possible to detect virus infection within the nematodes at any evaluated stage of the cycle.

The infectivity of viral particles was affected by the presence of a substrate, which allowed them to persist until nine weeks if they were submerged in the dark at 25 °C. On the other hand, the prevalence declined from 64% to 8% in four weeks with artificial light. In the absence of substrate, no maintenance of infectivity was observed beyond one week.

It is concluded that the virus introduced into a natural breeding environment of *C. pipiens* can be kept infective for a very long time. This would be possible, in addition to the effect of the maintenance in the substrate, by the asynchronous death of infected mosquito larvae, allowing the permanence of inoculum in the environment. Furthermore, the viral particles in the corpse remain protected and retain infectivity for several days. By host range studies, the susceptibility of *Culex apicinus*, *Aedes (Stegomyia) aegypti* and *Aedes (Ochlerotatus) albifasciatus* to this virus was verified, although the viral prevalence was significantly different among species, thus demonstrating the low specificity of this isolate.

|

Introducción General

Introducción General

Es de público conocimiento la importancia cada vez mayor que tienen los mosquitos como vectores de enfermedades del hombre y de los animales domésticos considerando que las enfermedades transmitidas por ellos representan más del 17% de todas las enfermedades infecciosas, y provocan cada año más de 1 millón de defunciones. La distribución de estas enfermedades está determinada por una dinámica compleja de factores medioambientales y sociales. En los últimos años, la globalización de los desplazamientos y el comercio, la urbanización no planificada y los problemas medioambientales, entre ellos el cambio climático que produce modificaciones en las prácticas agrícolas debidos a las variaciones de temperatura y precipitaciones, están influyendo considerablemente en la transmisión de enfermedades. Algunas, como el dengue, la fiebre chikungunya y la fiebre del Nilo Occidental, están apareciendo en países en los que hasta hace poco eran desconocidas (Nota descriptiva N°387. Febrero de 2016. OMS). Estas infecciones causadas por virus transmitidos por artrópodos (arbovirus), constituyen enfermedades emergentes y re emergentes de difícil control en todo el mundo. Este grupo de enfermedades comparte el mecanismo de transmisión, las acciones de control y las características clínicas (Boletín Integrado de Vigilancia-N°272-SE33, 2015). Se hace evidente la necesidad de métodos de control de vectores más eficaces que los empleados hasta ahora. Un mayor conocimiento en este sentido nos ayudará a evaluar nuevas perspectivas para el control de los mosquitos desde el punto de vista del Manejo Integrado.

La Familia Culicidae y su importancia sanitaria

Los mosquitos están taxonómicamente ubicados en la familia Culicidae del Orden Diptera. Los Culícidos comprenden alrededor de 3500 especies incluidas en dos subfamilias, Anophelinae y Culicinae (Knight y Stone, 1977) ambas incluyen integrantes de importancia sanitaria. Los mosquitos son los vectores de enfermedades mejor conocidos, pudiendo transmitir al hombre y a otros animales una variedad de virus, y parásitos. Entre los parásitos transmitidos, podemos encontrar los que producen

filariosis linfática en humanos, como son los nematodos de los géneros *Wuchereria* y *Brugia*. Otro nematodo problema para los animales domésticos es la filaria del corazón de los perros, *Dirofilaria immitis* (Leidy) (Beaty y Marquardt, 1996).

Un protozoo de importancia sanitaria transmitido por mosquitos del género *Anopheles* es el *Plasmodium*, causante de Malaria, enfermedad grave para la cual la OMS estima que al menos la mitad de la población mundial está en riesgo de infección.

Por otro lado, es notable la variedad y la importancia de las enfermedades causadas por arbovirus, muchos de ellos pertenecientes a las familias *Flaviviridae* y *Togaviridae*. Según la OMS más de 2500 millones de personas, en más de 100 países, corren el riesgo de contraer dengue (Nota descriptiva N°387 Febrero de 2016, OMS). La cifra aumenta si tenemos en cuenta otras arbovirosis. Los mosquitos implicados en la transmisión de estos patógenos son especies de dos géneros globalmente distribuidos *Aedes* y *Culex*. Las enfermedades más importantes a nivel mundial son: Dengue, Fiebre Amarilla, Fiebre del Valle del Rift, Chikungunya, Zika, Encefalitis Japonesa y Fiebre del Nilo Occidental (Clements, 2012). Como sus nombres indican son males que comparten características clínicas, entre sus síntomas son comunes la fiebre alta, hemorragias, artralgias, mialgias y encefalitis.

La invasión humana en áreas remotas como selvas y tundra que incrementa el contacto entre el hombre y el vector, puede conducir al descubrimiento de nuevos patógenos causantes de enfermedades del hombre.

Importancia sanitaria de la familia Culicidae en Argentina

En Argentina, la enfermedad transmisible por mosquitos más extendida es el dengue, los vectores son dos especies del género *Aedes* y subgénero *Stegomyia*, *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) distribuida por toda la zona de riesgo y como potencial vector secundario *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) restringida a la zona noreste del país (Rossi et al., 1999; Vezzani y Carbajo, 2008). El área de distribución de la enfermedad abarca gran parte del país, Noroeste y Noreste argentinos, Centro este y Área Metropolitana de Buenos Aires y Cuyo. En el año 2015, hasta la semana 26 (período epidémico) se registraron brotes de dengue en 15 jurisdicciones del país con un total

de 41.207 casos confirmados o probables autóctonos (Boletín integrado de vigilancia N° 343-SE02-Enero de 2017).

Otra enfermedad emergente en Argentina es la fiebre Chikungunya, una enfermedad transmitida por las mismas especies de mosquitos que el dengue y muy similar en la sintomatología. Durante la primera mitad de 2016 se registraron brotes en Salta (329 casos) y en Jujuy (9 casos). El último caso confirmado autóctono correspondió a la semana 20 (Boletín integrado de vigilancia N° 343-SE02-Enero de 2017). La Fiebre Amarilla, una enfermedad tropical, también transmitida por *Aedes* y por el género *Haemagogus* (Williston). Está restringida al norte del país y cuenta con una vacuna que es la medida preventiva más importante, es segura y muy eficaz. (Nota informativa N°100 Marzo de 2014). Recientemente se ha registrado circulación en Argentina de otro flavivirus poco conocido, llamado Zika. En la semana epidemiológica 8 de 2016 se notificó el primer caso de transmisión local de virus por vía sexual en la provincia de Córdoba. Posteriormente, entre las semanas 13 y 21 de 2016 tuvo lugar el primer brote de transmisión vectorial registrado en Argentina, en la provincia de Tucumán. En el mismo se confirmaron 25 casos (Boletín integrado de vigilancia N° 343-SE02-Enero de 2017).

Importancia sanitaria particular del complejo *Culex pipiens*

Los miembros del complejo *Culex pipiens* L. son importantes vectores de enfermedades del hombre y de animales domésticos. En la Argentina, el virus de la encefalitis de San Luis se ha reconocido desde 1963. Se reportaron pocos casos de infecciones agudas por esta causa en los últimos años, siendo el brote más grande el ocurrido en la provincia de Córdoba en 2005, con 48 casos, 9 de ellos fallecidos y más recientemente, el brote en la ciudad de San Juan en el año 2011. Se han identificado también casos aislados en Buenos Aires, Ciudad de Buenos Aires, Chaco, Santa Fe, Entre Ríos, Tucumán y Jujuy (Datos del Ministerio de Salud de la Nación, 2016). Esta enfermedad es transmitida por mosquitos del género *Culex* siendo la principal especie *Culex quinquefasciatus* Say mientras que *Culex interfor* Dyar podría tener un posible rol como vector alternativo (Monath et al., 1985; Almirón et al., 2006). Otra enfermedad transmitida por mosquitos del género *Culex* pero también por el género *Aedes* es la Fiebre del Nilo Occidental, que al igual que la Encefalitis de San Luis es transmitida por

mosquitos que pican aves migratorias infectadas y luego transmiten el virus a humanos, caballos y a otras aves. Se ha establecido que la Fiebre del Nilo no se transmite de persona a persona pero podría transmitirse vía transfusión sanguínea (Ministerio de Salud y Ambiente de la Nación, 2016).

Complejo *Culex pipiens*: biología, ecología y taxonomía

Características biológicas y ecológicas generales

Los mosquitos son insectos holometábolos, por lo que su ciclo vital comprende cuatro estados: huevo, larva con cuatro estadios larvales (L1, L2, L3 y L4) (Fig. 1), pupa (Fig. 3) y adulto (Fig. 4). El cuerpo de la larva está dividido en tres partes: cabeza, tórax y abdomen (Fig. 1). La cabeza está provista de mandíbulas quitinosas modificadas con estructuras en forma de cepillos que utilizan para filtrar materia orgánica y microorganismos suspendidos en el agua, también recogen del hábitat restos vegetales en descomposición (Clements, 1992). El sistema digestivo de estos insectos excede su función alimentaria ya que es muy importante en la regulación iónica y osmótica y representa una barrera primaria contra las infecciones. Está dividido en tubo digestivo anterior, medio y posterior. El tubo digestivo anterior consta de la faringe y un esófago del cual derivan las glándulas salivales. El tubo digestivo medio está formado por una parte anterior (los ciegos gástricos y la parte anterior del estómago) y una parte posterior (parte posterior del estómago). El tubo digestivo posterior comprende los túbulos de malpighi, el píloro, el intestino, el recto y el canal anal (Fig. 2). Además en una zona comprendida entre el esófago y el tubo digestivo medio, las células epiteliales segregan una fina membrana compuesta por quitina y proteínas llamada matriz peritrófica, la cual se extiende posteriormente y protege al tubo digestivo medio de partículas abrasivas y de microorganismos patógenos (Clements, 1992).

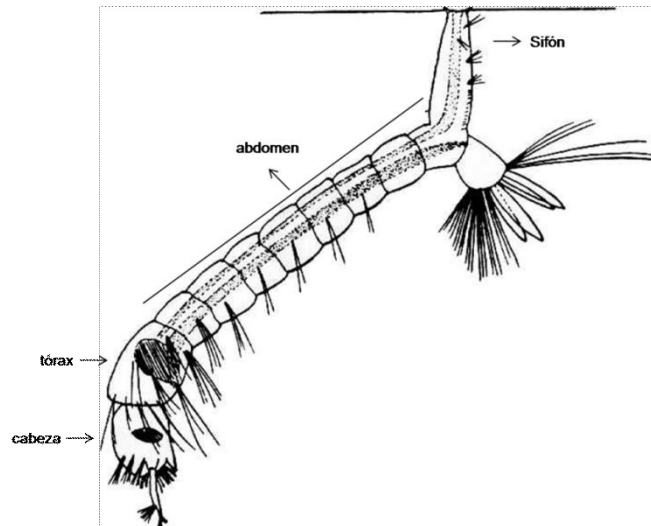


Figura 1. Larva de mosquito. Se distingue la división del cuerpo en cabeza, torax y abdomen. El sifón es la estructura utilizada para captar aire de la superficie.

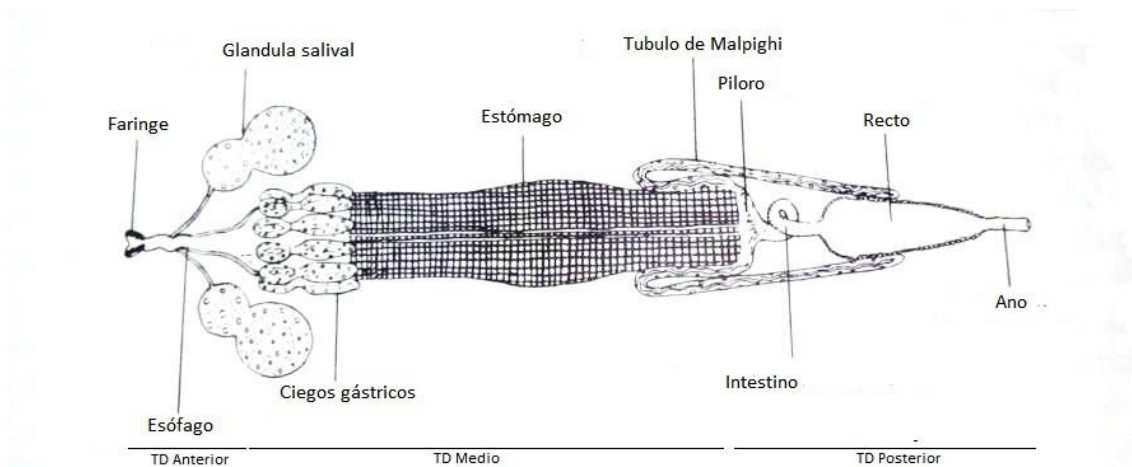


Figura 2. Esquema del tubo digestivo (TD) y glándulas salivales de una larva de culícido. Extraído y modificado de Clements, 1992.

Al final del abdomen se encuentra una estructura llamada sifón con la cual rompen la tensión superficial del agua para captar aire de la superficie (Fig. 1). La pupa presenta cabeza y tórax fusionado formando una estructura llamada cefalotórax. A pesar de ser un estado inmaduro activo no se alimenta, la captación de aire se produce a través de dos estructuras llamadas trompetas (Fig. 3).

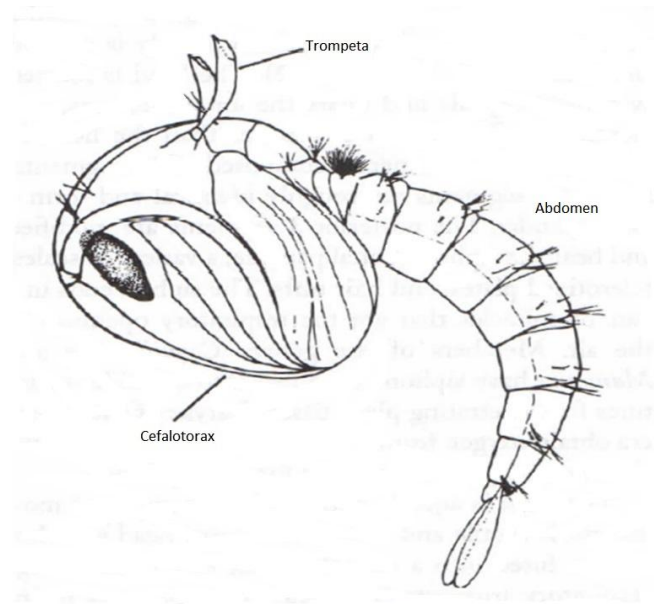


Figura 3. Pupa de mosquito mostrando sus divisiones principales.

La tagmosis del adulto comprende cabeza, tórax y abdomen (Fig. 4). La cabeza de la hembra porta un aparato bucal suctor-picador que es utilizado para la hematofagia y para obtener sustancias vegetales azucaradas como néctar y exudados de frutos. El aparato bucal del macho presenta la misma forma general pero con reducción o pérdida de algunas partes componentes y solo se alimenta de jugos vegetales. El macho y la hembra presentan dimorfismo sexual a nivel de antenas, palpos maxilares y tamaño corporal (Fig. 5). Las especies pertenecientes a este complejo presentan actividad hematófaga nocturna, se alimentan con preferencia sobre aves pero también sobre mamíferos. Este comportamiento hace posible que estos mosquitos sean importantes en la transmisión de algunos virus que desarrollan su ciclo en aves pero pueden transmitirse al hombre y animales domésticos a través de la picadura; son ejemplos el Virus del Nilo Occidental y la Encefalitis de San Luis. La hembra necesita de la ingesta sanguínea para producir sus huevos aunque en este complejo de especies también existe un comportamiento llamado autogénia, que es la capacidad de producir un primer lote de huevos aun sin haber ingerido sangre (Clements, 1992).

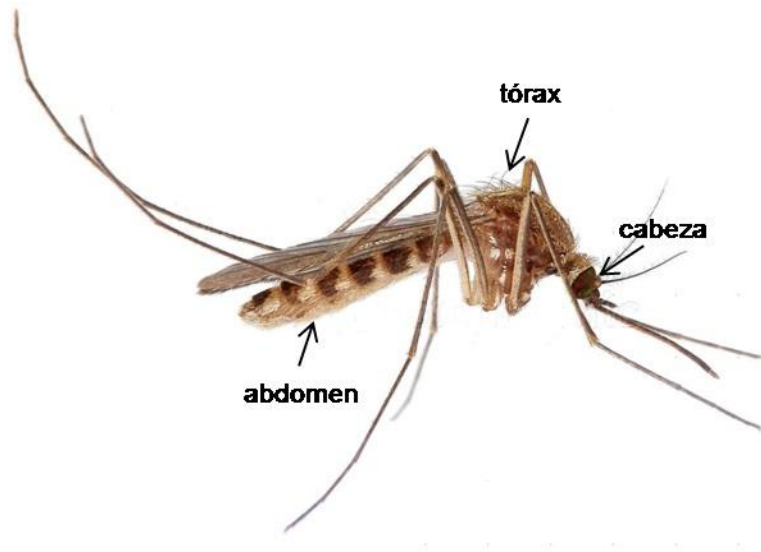


Figura 4. Mosquito adulto (hembra), cuerpo dividido en cabeza, tórax y abdomen.

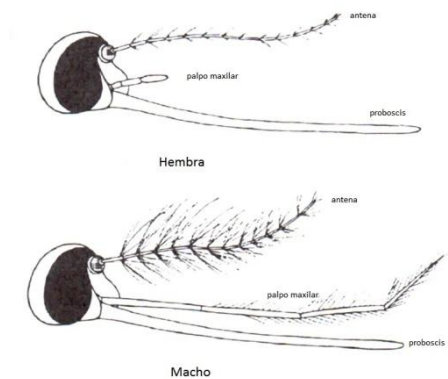


Figura 5. Diferenciación sexual a nivel de la cabeza del mosquito adulto. Se observan los palpos maxilares y las antenas mas desarrollados en el macho.

La oviposición se efectúa directamente sobre la superficie del agua, de modo tal que los huevos son colocados agrupados verticalmente en forma de balsas (Fig. 6). Debido a que esta especie cría en cuerpos de agua en general permanentes y al modo de ovoposición, este grupo de especies muestra generaciones superpuestas, pudiendo hallarse al mismo tiempo y en el mismo sitio, larvas de distintos estadios y pupas. Estos mosquitos se caracterizan por tener un gran potencial adaptativo, pudiendo sus estados inmaduros sobrevivir en una gran variedad de hábitats con rangos amplios de pH (4.4 a 9), salinidad (0.75% a 1%) y polución (Vinogradova, 2000).



Figura 6. Hembra de *Culex pipiens* oviponiendo sobre la superficie del agua (a). Se observan los huevos colocados verticalmente en forma de balsa. Una balsa (b), presenta coloración marrón luego de la esclerotización del corion tiempo después de efectuada la puesta.

Distribución y taxonomía

Perteneciente a la Clase Insecta, Orden Diptera y Familia Culicidae, el complejo *C. pipiens* es un conjunto de especies y subespecies evolutivamente relacionadas, con predominio de unas u otras según el área geográfica analizada. La distribución de este grupo es global, formado por especies invasoras con distribuciones que se superponen estrechamente con la población humana. Zonas con superposición de especies y formación de híbridos se conoce que existen en tres partes del mundo, América del Norte, Argentina y Madagascar (Smith y Fonseca, 2004).

En América, el complejo *C. pipiens* está compuesto por dos principales especies, *Culex quinquefasciatus* adaptado a climas cálidos y *C. pipiens* que se encuentra en zonas más frías e híbridos entre ambas especies. *C. pipiens* tiene dos formas conocidas o ecotipos, la forma *pipiens* y la forma *molestus*, que difieren ampliamente en su comportamiento y fisiología, las diferencias más notables son la capacidad de diapausa y la autogénia (Vinogradova, 2003). Particularmente en un estudio realizado en tres sitios localizados dentro de la zona de muestreo de la presente tesis, dos en áreas suburbanas de la ciudad de La Plata y una en la ciudad de Berisso, fue detectado un alto grado de hibridación entre las especies *C. pipiens* f. *molestus* y *C. quinquefasciatus*; para dicho estudio se utilizaron caracteres morfológicos y marcadores moleculares de alta resolución (microsatélites) (Micieli et al., 2013). Estos híbridos suelen tener características intermedias como se ha demostrado a través de estudios de genitalia, polimorfismo de alozimas y análisis de microsatélites (Farajollahi et al., 2011). Debido

a la dificultad de aplicar la tradicional identificación morfológica, la taxonomía de este grupo se mantiene controversial (Farajollahi et al., 2011).

El entendimiento del complejo *pipiens* ha sido considerado uno de los mayores problemas en la taxonomía de mosquitos, debido a la dificultad de interpretación sobre cuestiones morfológicas, fisiológicas, de comportamiento y genéticas (Vinogradova, 2000).

Distribución en Argentina

La distribución del complejo *pipiens* en Argentina comprende *C. quinquefasciatus* desde las provincias de Buenos Aires y Mendoza hacia el norte del país mientras que *C. pipiens* se encuentra desde Buenos Aires hacia el sur hasta la provincia de Santa Cruz. Las formas híbridas han sido halladas en el centro del país (Brewer et al., 1987; Almirón et al., 1995; Humeres et al., 1998).

Control de culícidos en el mundo.

Los insecticidas químicos como por ejemplo los organofosforados y los piretroides han sido utilizados ampliamente para controlar a los culícidos y resultan eficaces en el corto plazo y en situaciones de brote epidémico. A pesar de ello su uso está siendo restringido o altamente regulado en muchos países debido a que son poco efectivos en el mediano y largo plazo, poseen baja o nula especificidad, producen desarrollo de resistencia en los insectos y deterioran el ambiente, la salud humana y son tóxicos para organismos no blanco. Por estos motivos la tendencia mundial en cuanto al manejo de culícidos en el mundo es hacia el Control Bioracional, definido como una estrategia que emplea el control biológico (patógenos, parásitos y depredadores naturales de los mosquitos) así como la utilización de químicos sintéticos que imitan sustancias naturales (Ej. Análogos de la hormona juvenil) de tal manera que el control de mosquitos es obtenido con el mínimo impacto sobre el ambiente y organismos no blanco (Floor, 2007). Cuando se utilizan en condiciones apropiadas, los agentes bioracionales pueden ser un importante acompañamiento en programas de Manejo

Integrado de Mosquitos, una alternativa segura para el ambiente, más específica y puede ser eficaz a largo plazo.

Otro tipo de control poblacional empleado en la actualidad con base genética, es la liberación de machos estériles transformados genéticamente sobre la base de la tecnología descrita por Thomas et al., 2000. El control de las enfermedades transmisibles que no intenta diezmar la población del insecto sino disminuir su capacidad vectorial es mediante la utilización de organismos simbioses como por ejemplo bacterias del género *Wolbachia* que producen incompatibilidad citoplasmática y bloqueo de patógenos. El aumento de la resistencia a los patógenos virales y protozoos, ha recibido atención desde su descubrimiento inicial en *Drosophila melanogaster* Meigen y está siendo explotado como un enfoque para el biocontrol de vectores de enfermedades (Moreira et al., 2009; Iturbe - Ormaetxe et al., 2011; McGraw y O'Neill, 2013)

Conocimiento de los parásitos y patógenos de culícidos en el mundo.

Se han citado como causantes de mortalidad en culícidos: virus, protozoos, hongos, nematodos y depredadores (Vega y Kaya, 2012; Jenkins, 1964; Roberts y Castillo, 1980; Roberts y Strand, 1977). A pesar de haberse descrito una amplia variedad de enemigos naturales afectando a los culícidos, la mayoría no han sido suficientemente estudiados como agentes de control biológico. Hasta el momento es insuficiente el conocimiento existente sobre la biología, la ecología, sus funciones reguladoras de las poblaciones y las interacciones de los mismos entre sí y con los insectos blanco.

Los peces larvívoros y los biolarvicidas basados en esporas y cristales de las bacterias esporulantes *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* de Barjac y *Bacillus sphaericus* Neide han sido los de mayor difusión y éxito mundial (Federici, 1995). Un bioinsecticida conteniendo un *Brevidensovirus* (Fam. *Parvoviridae*), ha sido el único producto comercial hasta el presente basado en virus, el cual ha sido evaluado en laboratorio y a campo en pequeña escala en poblaciones de *Aedes aegypti* con niveles de control de 77% (Becnel y White, 2007). Los ensayos a gran escala han sido

pospuestos hasta el desarrollo de métodos económicos de producción in vitro o in vivo.

Situación en Argentina

En la Argentina se han detectado variados parásitos y patógenos en poblaciones naturales de culícidos.

Parásitos

El nemátodo mermitido *Strelkovimermis spiculatus* Poinar y Camino fue hallado por primera vez en Argentina (Poinar y Camino, 1986). Posteriormente se realizaron numerosos estudios acerca de la biología y la cría en laboratorio (Achinelly y Micieli, 2011; Micieli et al., 2012). Otro parásito que ha sido citado en larvas de *Aedes aegypti* es *Ascogregarina culicis* (Ross) (Dellapé et al., 2005; Vezzani y Wisnivesky, 2006). Entre los microsporidios podemos mencionar varias especies de *Amblyospora* (García y Becnel, 1994; Micieli y García, 1997; Micieli et al., 2000a y b) y *Hazardia milleri*, hallado en larvas de *C. pipiens* (Campos et al., 1993).

Patógenos

Numerosos patógenos han sido hallados en culícidos de Argentina. El estudio sobre bacterias comprende el hallazgo, aislamiento caracterización y evaluación de la actividad mosquitocida de cepas pertenecientes a los géneros *Lysinibacillus* (Tranchida et al., 2011) y α -proteobacteria (Tranchida et al., 2012) En cuanto a los hongos entomopatógenos han sido estudiados variedad de especies como por ejemplo *Aphanocladium album* Preuss y *Tolypocladium cylindrosporum* Gams (Lopez Lastra et al., 1992). Actualmente se halla en estudio y en vías de formulación *Leptolegnia chapmanii* Seymour (Pelizza et al., 2007; Rueda Páramo et al., 2015).

Virus patógenos de culícidos

Los virus entomopatógenos son un grupo bien representado, con miembros incluidos en siete Familias de virus como parásitos de culícidos, siendo las más relevantes y frecuentes, *Baculoviridae* (DNA), *Iridoviridae* (DNA), *Parvoviridae* (DNA) y *Reoviridae* (RNA). Los *Baculoviridae* han sido los más profundamente estudiados como

potenciales agentes de control de insectos perjudiciales debido a las características especiales que posee, entre ellas: elevada especificidad, limitado espectro hospedador y resistencia en el ambiente.

Familia *Baculoviridae*

La familia *Baculoviridae* consiste en virus de ADN doble cadena que se caracterizan por ser patógenos exclusivos de artrópodos. Han sido estudiados intensamente por su potencial como agentes de control de plagas y su destacado papel como vectores de expresión de genes. Alrededor de 400 especies de lepidópteros sirven como hospedadores para estos virus, aunque también han sido reportados para especies de los órdenes Hymenoptera, Diptera, Siphonaptera y Trichoptera así como en varias especies de crustáceos. Baculovirus en Diptera han sido infrecuentemente reportados y a muy bajas prevalencias en poblaciones naturales de insectos de la familia Culicidae (Federici, 1985). Los registros se limitan a la especie CuniNPV, hallado en larvas de *Culex nigripalpus* (Theob.) y *Culex quinquefasciatus* Say (Becnel et al., 2001) en Estados Unidos y otro aislamiento en *C. quinquefasciatus* en Brasil (Alves et al., 2012). Los baculovirus de mosquitos, a diferencia de los de lepidópteros, han sido problemáticos en cuanto a su transmisión en laboratorio y por lo tanto los estudios de la biología básica se han visto obstaculizados (Federici, 1985).

El término *Baculoviridae*, del latín baculum, hace referencia a la forma de la nucleocápside que se asemeja a un bastón. Son virus envueltos cuyo diámetro oscila entre 30 y 60 nm y su largo es de aproximadamente 300 nm. Esta familia también se caracteriza por ser una de la pocas que forman cuerpos de oclusión (OB, Occlusion body) (Fig. 7). Estos cuerpos están formados por proteínas codificadas por el virus que cristalizan formando una matriz con forma de poliedro irregular (poliedrina) o gránulo (granulina) en la cual quedan incluidos uno o varios viriones. Este cuerpo de oclusión es muy importante porque les permite preservar la capacidad infecciosa fuera del huésped; son insolubles en agua y resistentes a la putrefacción y desintegración por agentes químicos (Benz, 1986) y también a tratamientos físicos como la congelación, desecación y liofilización (Jacques, 1985)

Es característico de los baculovirus poseer dos tipos de viriones que se diferencian por la procedencia de la envoltura lipídica. Algunas nucleocápsides permanecen en la misma célula en la que han sido sintetizadas y, en tal caso, adquieren una membrana sintetizada de novo (Stoltz et. al., 1973) dando lugar a la formación de viriones que, posteriormente, quedan incluidos en matriz proteica. A estos viriones se los conoce como derivados de cuerpos de oclusión (ODV; oclusión derived virus) (Wood et. al., 1993) (Fig. 7). Otras nucleocápsides una vez sintetizadas se mueven y abandonan la célula huésped, en este caso, la nucleocápside adquiere la membrana a partir de la membrana citoplasmática de la célula cuando la atraviesa por puntos concretos donde se encuentra insertada la glicoproteína GP64 codificada por el virus (Blissard y Rohrmann, 1990). A los viriones que se forman de esta manera se los conoce como viriones brotados (BV; budded virus) (Fig. 7).

Morfológicamente, los viriones ODV pueden ser de dos tipos distintos, los que contienen una sola nucleocápsida por virión, denominados viriones simples (S; single) y los que contienen un número variable de nucleocápsides por virion (M; múltiple). Los ODV ya sean de uno u otro tipo son los responsables de la transmisión horizontal de la enfermedad así como de iniciar la infección primaria en las células del intestino medio (Granados y Williams, 1986). Los BV contienen una sola nucleocápsida. Estos viriones, a diferencia de lo que ocurre con los ODV, son elementos infecciosos que solo se producen en los baculovirus poliorganotróficos, es decir, en aquellos en los que, además de infectar las células epiteliales del intestino como ocurre en culícidos, infectan también el resto de los tejidos, por ejemplo en lepidópteros (Federici, 1997). Los BV son los responsables de diseminar la infección entre los tejidos de un mismo individuo infectado.

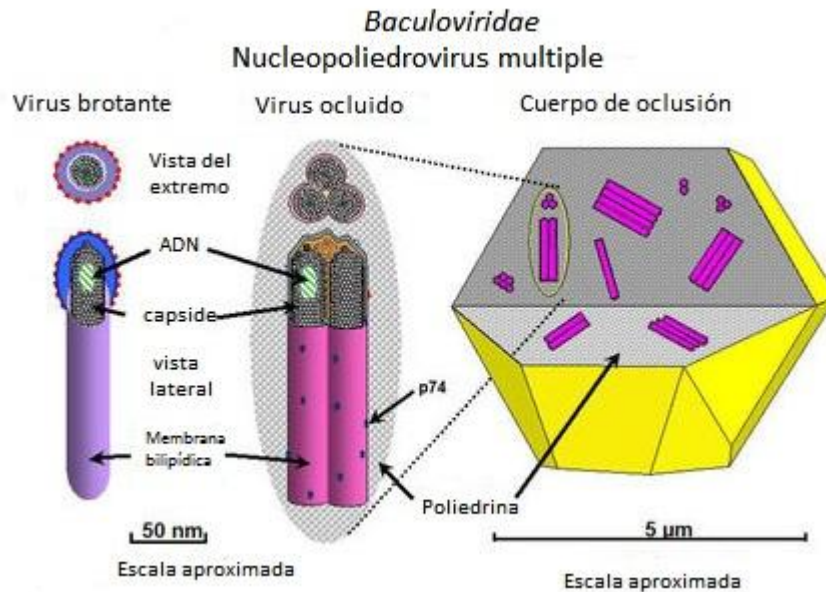


Figura 7. Estructura interna de las diferentes formas en que se presentan las partículas virales de la familia *Baculoviridae*. Virus brotantes (BV, budded virus), virus ocluidos (ODV; oclusión derived virus) y cuerpos de oclusión (OB, Occlusion body).

Taxonomía

La familia está dividida en cuatro géneros (Jehle et al., 2006), basándose en evidencia filogenética y características morfológicas y biológicas. Las especies virales se nombran según la especie hospedadora y el tipo de virus, por ejemplo el baculovirus encontrado en *Autographa californica* (Speyer) fue denominado AcMNPV (virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Autographa californica*).

Alphabaculovirus: específicos del Orden Lepidoptera. Sus OBs están compuestos mayoritariamente por poliedrina (NPV) y presentan un tamaño entre 0,8 y 2 µm. Morfológicamente, los viriones ODV pueden contener una o más nucleocápsides (SNPV o MNPV). El tamaño del genoma se encuentra en el rango de 110-170 kpb. La especie tipo es AcMNPV.

Betabaculovirus: también son específicos de lepidópteros, pero a diferencia de los alphabaculovirus sus OBs están formados por granulina y se caracterizan por contener

un solo ODV con una única nucleocápside. Tienen un tamaño promedio de 0,13 a 0,5 μm . La especie tipo es CpGV (virus de la granulosis de *Cydia pomonella*) (L.).

Gammabaculovirus: se han hallado solo en insectos del Orden Hymenoptera. El tamaño de los OBs se encuentra en el rango 0,4-1,1 μm y presentan viriones simples. Poseen un tamaño del genoma de aproximadamente 90 kpb. No presentan virus brotantes. La especie tipo es NeleNPV (virus de la poliedrosis nuclear de *Neodiprion lecontei* (Fitch)).

Deltabaculovirus: Son específicos del Orden Diptera. La especie tipo es la única perteneciente a este género descrita hasta el momento. Aunque se denomina CuniNPV (Virus de la poliedrosis nuclear de *Culex nigripalpus*), sus OBs están formados por una proteína no homóloga a la granulina o poliedrina y presentan un diámetro de aproximadamente 400 nm.

Ciclo viral

El ciclo de la infección comienza cuando los cuerpos de oclusión son ingeridos por las larvas del insecto. En el intestino, los cuerpos de oclusión se diluyen debido a la alta alcalinidad de sus jugos intestinales (pH 9.5-11). Una vez liberados los viriones deben atravesar la matriz peritrófica del intestino (Fig. 8). En tal sentido, se han estudiado los efectos producidos por proteínas (VEFs o virus enhancing factors) contenidas en gránulos de GV. Estas proteínas actúan alterando la integridad de la matriz peritrófica y aumentando la infectividad del baculovirus (Derksen y Granados, 1988). Otra posibilidad estudiada consiste en que los viriones alcancen las microvellosidades del intestino medio cuando se produce la muda del insecto, ya que la matriz peritrófica es liberada durante el proceso de ecdisis y por lo tanto, esta no constituiría una barrera importante para la infección (Volkman, 1997; Washburn et al., 1995). En baculovirus de culícidos, específicamente CuniNPV, Becnel et al. (2001) demostraron la importancia de los iones presentes en el agua para la transmisión del virus. Para producir altos niveles de infección, iones Mg^{++} deben estar presentes durante las primeras 8-12 horas de la exposición al virus indicando que la actividad del mismo

ocurre temprano en el proceso de infección. Observaciones de microscopio electrónico de los OBs en el intestino medio, han revelado que el magnesio no es requerido para la disolución de los mismos. También se considera que algunos receptores sobre las células epiteliales o sobre la matriz peritrófica o enzimas asociadas con el virión pueden ser requeridas para iniciar la infección (Becnel et al., 2001).

Los signos y síntomas de la infección producida por baculovirus se hacen evidentes en estados avanzados de la enfermedad. El tejido afectado depende de la familia de insecto de que se trate. En el caso de los lepidópteros, todos los tejidos de la larva sufren infección. En general, se observa primeramente un cambio en la coloración, debido a la acumulación de cuerpos de oclusión en los tejidos afectados y en esta fase presenta color blanquecino o amarillento. Las larvas en este estado tienden a alejarse de la fuente de alimento, emigrando hacia las partes altas de la planta, donde mueren. Tras la muerte, los tejidos se desintegran, se produce la ruptura del tegumento larval y la liberación de masas de cuerpos de oclusión (Sciocco, 2001) (Fig. 9).

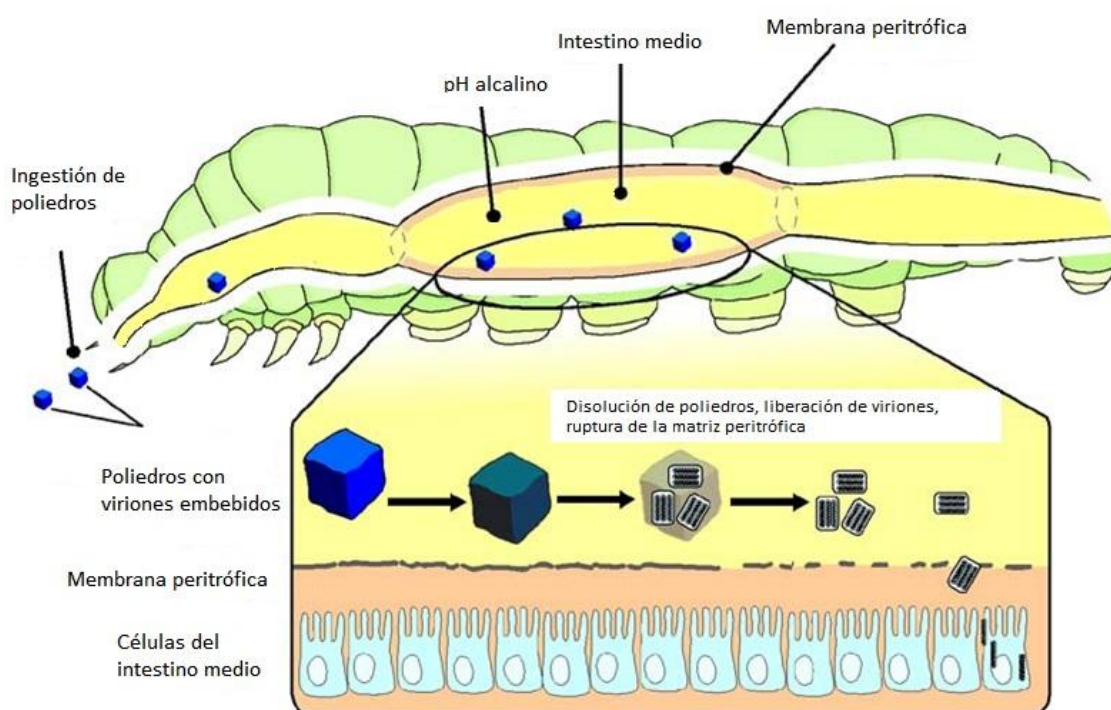


Figura 8. Transmisión horizontal por ingestión de un Nucleopoliedrovirus en una larva hipotética de lepidóptero. El cuerpo de oclusión es ingerido, las partículas son liberadas en el intestino tras la degradación del cuerpo proteico, atraviesan la matriz peritrófica e ingresan a las células del intestino para producir la infección.



Figura 9. Larva de *Spodoptera exigua* infectada con nucleopoliedrovirus en fase terminal.

En los dípteros culícidos el proceso tiende a ser bastante diferente ya que el NPV en las larvas de mosquito es específico para tejidos del tubo digestivo medio, afectando principalmente el epitelio intestinal (Becnel et al., 2001; Federici, 1985; Shapiro et al., 2004). Las infecciones patentes en este caso son detectadas por la hipertrofia de los núcleos de las células del intestino medio que aparecen blancos debido a la acumulación de los cuerpos de oclusión (Becnel et al., 2001; Federici, 1985; Shapiro et al., 2004). El baculovirus afecta la apariencia, comportamiento y desarrollo de la larva, la cual muere entre 72 y 96 horas post infección. Los cuerpos de oclusión son liberados en el ambiente acuático (Becnel, 2006) y posteriormente ingeridos por otras larvas.

Familia Iridoviridae

Esta familia de virus que incluye un gran número de aislamientos tanto de vertebrados como de invertebrados recibió su nombre debido a la coloración iridiscente característica de los individuos infectados, aunque no todas las especies la desarrollan. Los virus iridiscuentes de invertebrados han sido estudiados en un principio por su posible rol como controlador biológico de especies importantes para la agricultura y la salud pública. A pesar de ello, el estudio de la misma fue perdiendo interés debido a las bajas prevalencias y a que presentó un rango hospedador muy amplio en pruebas de laboratorio (Henderson et al., 2001). Posteriormente se descubrió una importante función reguladora de las poblaciones dado que produce efectos subletales que afectan negativamente el tiempo de desarrollo, la fecundidad, y otros factores (Marina et al., 1999).

Características de la partícula viral

Los iridovirus están caracterizados por su forma icosaédrica y un tamaño aproximado de entre 120 y 300 nm. La partícula viral es muy sencilla y consta de un núcleo de ADN rodeado por una membrana lipídica interna en la que se encuentran proteínas transmembrana y una cubierta o cápside formada por unidades protéicas llamadas capsómeros (Fig. 10). A diferencia de otros virus de ADN, las partículas virales pueden ser envueltas o desnudas dependiendo si las mismas son liberadas mediante brotación a través de la membrana plasmática o por lisis celular. Aunque ambos tipos de partículas son infecciosas, la infectividad de las envueltas es más alta sugiriendo que una o más proteínas de la envoltura juegan un rol importante en la entrada del virión a la célula (Williams et al., 2005). El origen de la membrana lipídica interna no está muy claro, su composición de lípidos hace suponer que la misma fue sintetizada *de novo*, sin embargo, analogías con otros virus hace suponer que la misma deriva de fragmentos del retículo endoplasmático de la célula huésped.

Otra particularidad de este virus es el efecto óptico que se produce cuando las partículas se encuentran agrupadas de forma masiva a modo de arreglo paracristalino que en el caso de los virus iridiscentes de invertebrados se observa como coloración brillante o iridiscente, evidenciando de esta manera la infección. Fue citada la existencia de iridiscencia de diferentes colores como naranja, azul, violeta o amarillo (King et al., 2012).

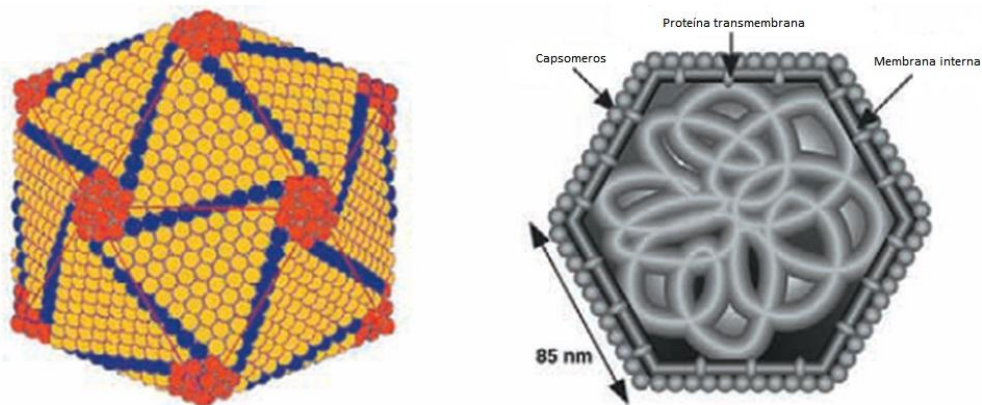


Figura 10. Virus iridiscente de invertebrados 2 (IIV-2). Diagrama esquemático de la partícula. Cubierta externa (izquierda) y corte a través de la misma mostrando los capsómeros, la bicapa lipídica con sus

proteínas transmembrana y el núcleo de ADN (derecha) (Extraído y adaptado de Darsie-Tripier et al., 1984).

Genoma

El genoma de los iridovirus está compuesto por ADN de doble hebra lineal y comprende 12-16 % del peso de la partícula; su tamaño oscila entre 140 y 303 kpb. Si tenemos en cuenta solo la porción no redundante, el rango se reduce de 102 a 212 kpb (King et al., 2012). Este grupo de virus se distingue de otras familias por su organización genómica, puesto que presenta redundancias terminales, está circularmente permutado y tiene elevado contenido del par GC (27-55 %). Otra característica particular de los géneros que afectan a vertebrados es la presencia de una enzima ADN-metiltransferasa viral, dichos genomas se encuentran altamente metilados, a diferencia de lo que sucede en los géneros de invertebrados, que no presentan esta enzima, por lo que sus genomas no se hallan metilados. Aunque el rol en la metilación del ADN no está claro, se sabe que es importante para la replicación del virus (Williams et al., 2005).

Los iridovirus tienen en común un conjunto de genes que codifican proteínas virales estructurales y catalíticas que permiten la replicación en un amplio rango de tipos celulares, sin embargo, las especies varían considerablemente en sus contenidos de genes no esenciales que los diferenciarían en su rango hospedador y en las estrategias de supervivencia (Eaton et al., 2007).

Un gen muy importante por ser altamente conservado es el de la proteína mayor de la cápside (MCP, según siglas en inglés) que forma hasta el 40% del total de la proteína viral (ICTV 2005).

Taxonomía

La familia *Iridoviridae* comprende virus patógenos tanto de vertebrados ectotermos (peces, anfibios y reptiles) como de invertebrados, principalmente insectos pero también crustáceos y moluscos de hábitat acuático o húmedo. La misma está organizada en cinco géneros basados en: tamaño de las partículas, rango hospedador, presencia de ADN metiltransferasa viral, contenido del par de nucleótidos GC, similitud

en el gen de la proteína MCP, patología clínica y otros criterios (King et al., 2012) (Tabla 1 y 2). Posteriores análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína MCP y otras proteínas virales confirman las divisiones taxonómicas en géneros e indican que especies pertenecientes a un mismo género comparten altos niveles de similitud. El Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) en su séptimo reporte definió una especie viral como “un grupo politético de virus que constituye un linaje replicativo y ocupa un nicho ecológico particular” o sea, virus de una misma especie deben tener muchas propiedades en común, pero pueden no compartir alguna de ellas. Debido a esto, la diferenciación de especies virales está basada en múltiples criterios, por ejemplo, perfil de proteínas virales, polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs), hospedadores, signos clínicos y diferencias en las secuencias de nucleótidos y aminoácidos.

La carencia de información sobre las secuencias de distintos aislamientos tanto en iridovirus de vertebrados como de invertebrados continúa siendo una traba para la clasificación taxonómica y resulta en elevado número de aislamientos tentativamente asignados o no clasificados (Chinchar et al., 2009). Entre los iridovirus de invertebrados, el género *Iridovirus* tiene dos especies reconocidas por el ICTV, mientras que *Chloriridovirus* solo la especie tipo (Tabla 1). Por otro lado, entre los iridovirus de vertebrados, los géneros *Lymphocystivirus* y *Megalocytivirus* están integrados solo por la especie tipo, mientras que el género *Ranavirus* es el más numeroso con un total de 6 especies (Tabla 2).

Tabla 1. Géneros de virus iridiscentes de invertebrados. Características distintivas y especies reconocidas por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus.

Virus iridiscentes de invertebrados (IIVs)		
	<i>Iridovirus</i>	<i>Chloriridovirus</i>
Especies reconocidas por ICTV (International Committee on Virus Taxonomy)	Invertebrate iridescent virus 1 (IIV-1) Invertebrate iridescent virus 6 (IIV-6) (especie Tipo)	Invertebrate iridescent virus 3 (IIV-3)(especie Tipo)
Hospedador	Insectos, crustáceos y moluscos	Mosquitos y jejenes (Diptera)
Características	-ADN no metilado de~ 212 kpb -Diámetro~120-130 nm -Contenido GC 27% -Replicación viral masiva resulta en un cambio de coloración de los insectos infectados (iridiscencia). -Son comunes infecciones asintomáticas.	-ADN no metilado de~ 135 kpb - Diámetro~180 nm -Contenido GC 54% -Replicación viral masiva resulta en un cambio de coloración de los insectos infectados (iridiscencia). -Son comunes infecciones asintomáticas.

Tabla 2. Géneros de virus iridiscentes de vertebrados. Características distintivas y especies reconocidas por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus.

Virus iridiscentes de vertebrados			
	<i>Ranavirus</i>	<i>Lymphocystivirus</i>	<i>Megalocytivirus</i>
Especies reconocidas por ICTV (international Committee on Virus Taxonomy)	Frog virus 3 (FV-3) (especie Tipo)	Lymphocystis disease virus 1 (LCDV-1) (especie Tipo)	Infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV)
Hospedador	Peces óseos, anfibios y reptiles de todo el mundo	Peces marinos y de agua dulce en todo el mundo	Peces marinos en el Sudeste Asiático
Características	<ul style="list-style-type: none"> -ADN metilado - Diámetro~150 nm -Contenido GC 49-55% -Infección sistémica que involucra a múltiples órganos internos -Lesiones parecidas a verrugas. 	<ul style="list-style-type: none"> -ADN metilado - Diámetro~200 a 300 nm -Contenido GC 27-29% -Infección sistémica que involucra múltiples órganos internos -Lesiones parecidas a verrugas. 	<ul style="list-style-type: none"> -ADN metilado - Diámetro~150 nm -Contenido GC 53-55% -Infección sistémica que involucra múltiples órganos internos -Mortalidad 100%

Ciclo de replicación viral en una célula

El conocimiento sobre la replicación de esta familia de virus es escaso y se limita a estudios en donde se utilizó como modelo la especie tipo del género *Ranavirus*: Frog Virus-3.

En una primera etapa la partícula viral entra en la célula por el mecanismo de endocitosis mediada por receptor. El ADN desnudo es transportado al núcleo donde comienza la primera fase de replicación. La expresión génica viral también comienza

en el núcleo donde los transcriptos virales tempranos son sintetizados usando el ADN viral como molde y comienza la transcripción de los genes primarios. El ADN viral recién sintetizado es transportado al citoplasma donde se produce otra etapa de replicación viral y comienza la síntesis de ARNm viral tardío. En el caso de las especies con metiltransferasa viral aquí también se produce la metilación del ADN. Le sigue la traducción y el ensamblaje de las partículas virales. Los viriones se ensamblan y se acumulan en el citoplasma en grandes arreglos paracristalinos o brotan a través de la membrana para luego infectar otras células (Williams et al., 2005) (Fig. 11 y 12).

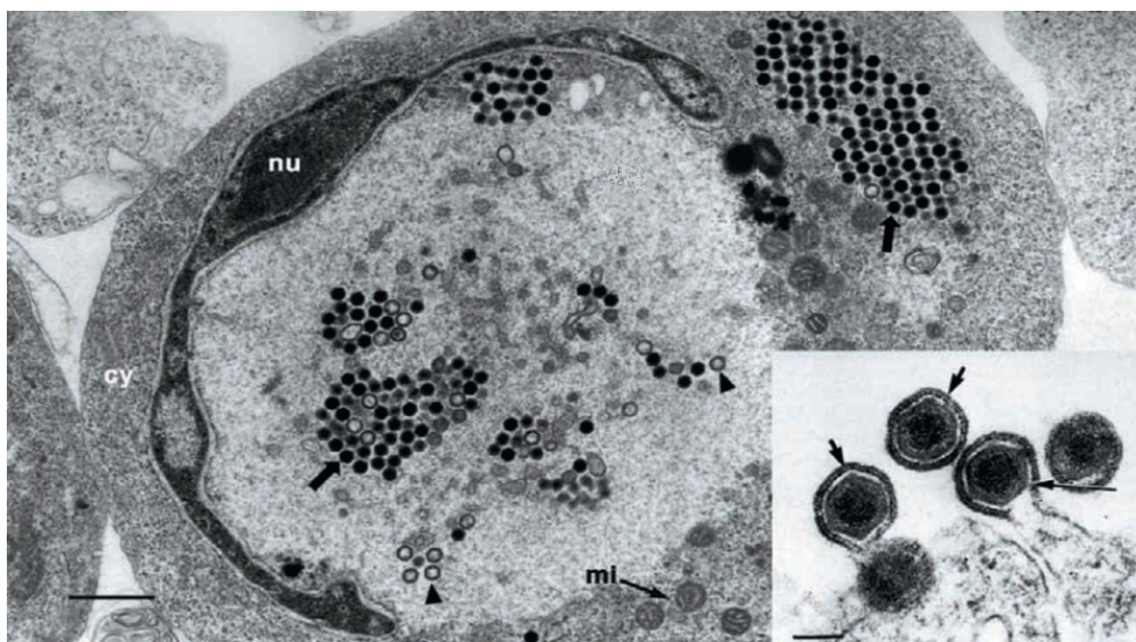


Figura 11. Imagen de microscopía electrónica de una célula infectada con un iridovirus de vertebrados. (Fondo izquierda) Núcleo (nu); arreglo paracristalino de partículas no envueltas (flechas); nucleocápsides incompletas (cabezas de flecha); citoplasma (cy); mitocondria (mi); la barra representa 1μm. (Inserto derecha) Microscopia electrónica de partículas virales de Frog virus- 3 (FV-3) brotando de la membrana plasmática. Las flechas indican la envoltura viral, la barra representa 200 nm. Extraído y modificado de Devauchelle et al., 1985.

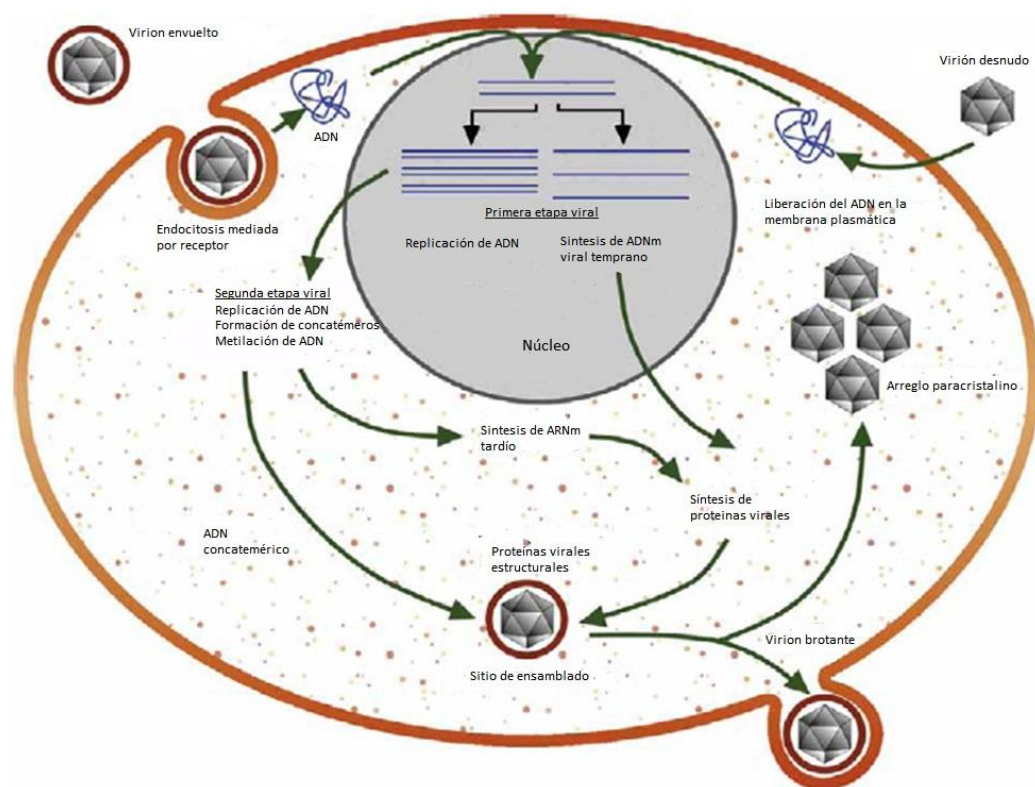


Figura 12. Ciclo de replicación del iridovirus de vertebrados Frog virus-3 en una célula (extraído y modificado de Chinchar et al. (2002)).

Chloriridovirus

La presencia de un virus iridiscente en mosquitos fue reportada por primera vez por Clark et al. en el año 1965 en mosquitos provenientes de Florida de la especie *Aedes (Ochlerotatus) taeniorhynchus* (Wiedemann). Durante los años siguientes, este virus ha sido detectado en varios otros géneros como *Psorophora* y *Culiseta*, aunque no en la especie transmisora del dengue *A (Stegomyia) aegypti*. Para el género *Culex* solo hay dos reportes de un virus iridiscente infectando *Culex territans* Walker de Rusia y Ucrania (Williams, 2008) y un solo reporte en *Culex pipiens* L. hallado en La Plata y Berisso (Muttis et al., 2012), dentro del marco de la presente tesis. Recientemente se reportó un nuevo aislamiento en adultos de *Anopheles* Meigen en China (Huang et al., 2015). A pesar de la existencia de aislamientos virales en una variedad de géneros y especies de mosquitos de diversas partes del mundo solo se reconoce como especie viral perteneciente al género *Chloriridovirus* a IIV-3 hallada en *A. taeniorhynchus*.

Objetivos

Objetivo General:

Contribuir al conocimiento de las patologías producidas por entomovirus en estados inmaduros de culícidos.

Objetivos específicos:

1. Realizar una prospección de los virus patógenos de culícidos en el área de estudio.
2. Identificar taxonómicamente las cepas de los virus aislados, por métodos ópticos y moleculares.
3. Realizar estudios de la patología producida por los virus hallados en larvas de mosquitos.
4. Conocer los mecanismos de transmisión horizontal involucrados en los ciclos virales.
5. Estudiar la persistencia de las partículas virales en laboratorio y en semicampo como herramienta para profundizar el entendimiento de los ciclos virales en el campo.
6. Estudiar la especificidad de los entomovirus realizando estudios de rango hospedador en especies de mosquito diferentes a la del hospedador original.

Capítulo 1

Prospección de patógenos virales en
poblaciones de culícidos de campo

Introducción

Durante los primeros años del desarrollo de la presente tesis se llevó a cabo un amplio muestreo en busca de patógenos virales en larvas de culícidos. La prospección tuvo lugar en poblaciones de mosquitos de diferentes especies que habitan en dos ambientes muy diferentes de la provincia de Buenos Aires, Argentina. Las especies halladas fueron *Aedes (Ochlerotatus) crinifer* (Theobald) y *Psorophora ferox* (Humboldt) en canales de inundación por fluctuaciones del Río de La Plata en la selva marginal de Punta Lara, ciudad de Ensenada. El otro ambiente fueron zanjas de desagüe domiciliario, uno de los sitios de cría habitual de *Culex pipiens* en la ciudad de La Plata y en la ciudad de Berisso. Como resultado de este estudio, se comprobó la presencia de un Baculovirus en *A. crinifer*. En *C. pipiens* se hallaron criaderos en los que se constató la presencia de larvas con sintomatología característica de un virus perteneciente a la familia *Iridoviridae* y un nematodo parásito de mosquitos.

Descripción del área de estudio

El área donde se desarrolló el estudio es un ambiente característico de la provincia biogeográfica Pampeana de la Región Neotropical, con un clima templado y presencia de lluvias durante todo el año (Cabrera y Willink, 1980). El área muestreada abarca las zonas suburbanas de las ciudades de Berisso, La Plata y Ensenada, Provincia de Buenos Aires, Argentina. Un tipo de hábitat particular de muestreo fueron las zanjas de drenaje domiciliarios (Sitio 1) a cielo abierto donde se estanca agua proveniente de lluvia y del drenaje de cocinas y lavaderos a lo que suele sumarse efluentes cloacales. Aunque la mayoría de las zanjas suelen tener períodos de inundación en épocas lluviosas y calor moderado y períodos secos en épocas de temperaturas altas, algunas suelen ser permanentes presentando niveles variables de agua durante todo el año. Las características del agua suelen ser variables, en algunos casos es cristalina y límpida y en otros cargada de materia orgánica y/o sustancias grasas. También es común el desarrollo masivo de algas en ciertas épocas del año. Según medidas estacionales de pH tomadas en diferentes zanjas se estableció que el mismo varía

entre 6.5 y 8 a lo largo del año, siendo levemente más ácido en invierno. Elementos como basura, pasto cortado, explosiones de crecimiento de ciertas algas y sustancias grasosas pueden dificultar el desarrollo larval, ya que al cubrir la superficie del agua imposibilitaría la respiración de los estados inmaduros. Factores como el último nombrado y los períodos secos ocasionan la desaparición temporal de estos criaderos de mosquitos. En este tipo de hábitat registramos comúnmente la presencia de especies del complejo *C. pipiens*. Se seleccionaron 4 zanjas con presencia de virus y agua durante gran parte del año. Una de ellas está situada en la ciudad de Berisso (Sitio 1.1: latitud -34.8698 longitud -57.8693) (Fig. 1.1a y 1.1b) y tres en la ciudad de La Plata (Sitio 1.2: latitud -34.8838 ° longitud -57.9671 °) (Fig. 1.2a y 1.2b), (Sitio 1.3: latitud -34.8657 ° longitud -58.0336 °) (Fig. 1.3), (Sitio 1.4: latitud -34.8829 ° longitud -57.9682).

En la zona de Punta Lara, Ensenada, se encuentra otro hábitat caracterizado como charcos de inundación que dependen casi exclusivamente de crecidas excepcionales del Río de La Plata (Sitio 2: latitud -34.7880 ° longitud -58.0188 °) (Fig. 2). Durante la bajante, quedan a su paso grandes charcos que van disminuyendo su superficie al cabo de días. Allí eclosionan, en el momento de la inundación, los huevos de mosquito puestos previamente en la tierra no inundada. En este tipo de hábitat encontramos *A. crinifer*. También se detectó la presencia de *Psorophora ferox* y *Psorophora ciliata* (Fabricius).



Figura 1.1. Sitio 1.1. Zanja de drenaje domiciliario en Berisso (a). Se observa floración de algas y basura cubriendo toda la superficie del agua (b).



Figura 1.2. Sitio 1.2. Zanja de drenaje domiciliario en La Plata (a). Se observan estados inmaduros de mosquito desarrollándose en agua turbia y con pasto cortado (b).



Figura 1.3. Sitio 1.3. Típica zanja de drenaje domiciliario en La Plata, el agua se ve translúcida.



Figura 2. Sitio 2. Charco de inundación por crecida extraordinaria del río de La Plata en Punta Lara, Ensenada

Materiales y métodos

Metodología general

Las muestras de agua con estados inmaduros de mosquitos proveniente de los diferentes sitios fueron tomadas con ayuda de un cucharón y una red, colocadas en contenedores plásticos y transportadas al laboratorio. Individuos de una submuestra fueron identificados usando claves taxonómicas (Darsie, 1985). Las larvas colectadas de cada muestra fueron observadas bajo microscopio estereoscópico binocular con el objetivo de determinar la presencia de patógenos virales. Para la detección de la sintomatología de la familia *Iridoviridae* se colocó a las larvas sobre un fondo oscuro y se las observó bajo lupa, de este modo se hizo evidente el color iridiscente característico de las infecciones por virus de esta familia (Becnel y White, 2007) (Fig.3). Para la detección de baculovirus se utilizaron métodos ópticos y moleculares. Para el método óptico se colocaron pequeños grupos de larvas en una capsula de Petri y se extrajo el agua excedente con una pipeta hasta que las larvas quedaron adheridas en el fondo de la misma. Posteriormente se colocó bajo lupa y se pudo observar por transparencia el intestino de la larva en faz dorsal y ventral invirtiendo la posición de la capsula. Se buscó detectar la hipertrofia característica de los núcleos celulares en los ciegos gástricos y el intestino posterior (Fig. 4) con reconfirmación en preparaciones entre porta y cubreobjetos al microscopio óptico compuesto con contraste de fases (Becnel y White, 2007).



Figura 3

Sintomatología del virus iridiscente de mosquitos sobre fondo oscuro. Se observan larvas infectadas con distintos tonos iridiscentes sobre la placa negra utilizada en la prospección (a). Comparación entre una larva sana y una larva infectada iridiscente (b).

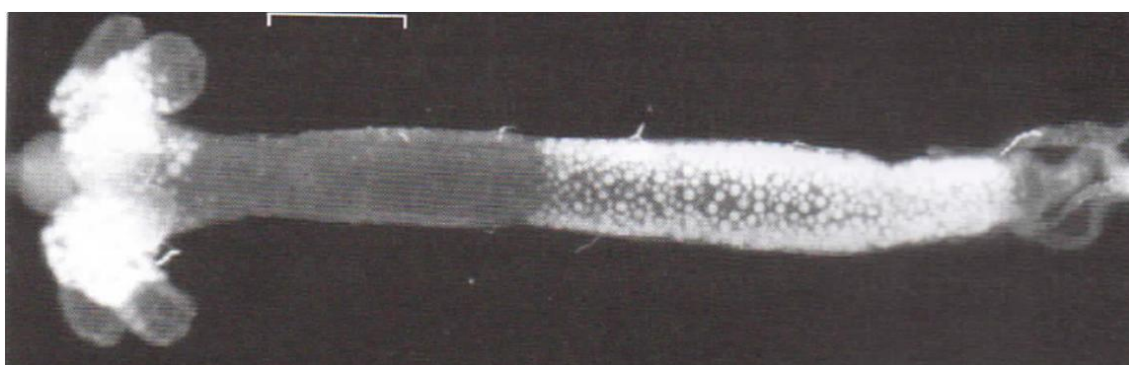


Figura 4. Baculovirosis en *Culex nigripalpus*. Tubo digestivo de una larva infectada con *CuniNPV* bajo iluminación de contraste de fase. Se observan en blanco los núcleos hipertrofiados del intestino medio y posterior. (Reproducido de Moser et al. (2001))

Materiales y métodos específicos para el Sitio 1

Los muestreos se llevaron a cabo desde septiembre del 2010 a enero del 2013 (ver Resultados, Tabla 1). Las larvas fueron observadas en busca de patógenos virales. La prevalencia del iridovirus y del nematodo fue calculada para cada muestra. Para

determinar el porcentaje de parasitismo del nematodo, entre 20 y 150 larvas de cuarto estadio fueron individualizadas en placas de cultivo celular con el agregado de agua declorinada, hasta la emergencia de los juveniles post parásitos. Los mismos se transfirieron a un recipiente con agua limpia en donde se los dejó madurar y llegar al estado adulto (Camino y Reboredo, 1994). Estos parásitos fueron identificados de acuerdo a la descripción original (Poinar y Camino, 1986). La prevalencia del virus fue calculada como el número de larvas infectadas sobre el número total de larvas colectadas en cada muestra. En muestras muy numerosas se estimó el total de larvas a partir del conteo de una alícuota. Para ello, las larvas fueron concentradas en 2 litros de agua, se agitó hasta obtener una suspensión visiblemente homogénea y se tomó una submuestra de 300 ml, se contó el número de larvas en la submuestra y se extrapoló para calcular el número total de larvas en la muestra. Con el objetivo de detectar la presencia de formas juveniles de nematodos en el hemocele de larvas con sintomatología de infección con el iridovirus, se llevaron a cabo disecciones de 45 larvas infectadas, 15 larvas de cada estadio larval 1er., 2do. y 3ero.

-Análisis estadísticos

Para determinar si la presencia de virus en larvas de campo está asociada a la presencia de nematodos se utilizó el test exacto de Fisher. Fue aplicado el coeficiente de Pearson para correlacionar la proporción de larvas infectadas con MIV en las muestras de campo con la proporción de larvas infectadas con nematodos en las mismas muestras.

Materiales y métodos específicos para el Sitio 2

Los muestreos se llevaron a cabo desde octubre de 2009 a marzo de 2012. Se analizó cada muestra en busca de patógenos virales según la metodología general antes descrita. De cada muestreo se almacenaron hasta 50 larvas por especie en tubos eppendorf y se conservaron congeladas a -20°C. Debido a que la sintomatología podría pasar desapercibida se realizó un análisis molecular (Reacción en Cadena de la Polimerasa, PCR) utilizando un protocolo que describe la metodología para la extracción y amplificación de ADN de larvas de mosquito para la detección de

baculovirus usando un segmento de una región conservada del gen factor 8 de expresión tardía (*lef8*). El cebador fue diseñado en el Center for Medical, Agricultural, and Veterinary Entomology CMAVE (USDA/ARS), Gainesville, Florida, USA. Las secuencias de los cebadores fueron las siguientes: *lef8R* 5'-ATGAAGCCCTTYTGGYCGTG- 3' Y *lef8F* 5'-HMSACSRMGAAGAYCCTTYATWCKAGC- 3'

Se realizó la extracción de ADN de cada muestra (ver Resultados, Tabla 2), según el siguiente protocolo que detecta una larva infectada en un conjunto de 50 individuos.

Protocolo de extracción de ADN para larvas de mosquitos

Para preparar la mezcla de digestión se calculó aproximadamente 220 µl para cada muestra teniendo en cuenta la pérdida por transferencia de volumen.

1. Para preparar 10 ml de mezcla de digestión se colocó 1 ml de SDS 10%, 500 µl de EDTA 0,5M, 150 µl de NaCl 5M, 100 µl de Tris.HCl (pH 8,00) 1M, 10 µl de ARNasa (1,0 µg/µl), 250 µl de Proteinasa K (20 mg/ml), 8 ml de agua destilada. La concentración final de cada reactivo en la mezcla fue: Tris 10 mM, NaCl 75 mM, EDTA 25 mM, SDS 1%, ARNasa 1,0 µg/µl, Proteinasa K 0,5 µg/µl.
2. Se homogenizó la muestra (hasta una larva infectada en cincuenta puede ser detectada). Se colocó una alícuota de aproximadamente 20 µl del homogenizado en un tubo eppendorf, y la porción restante se conservó a -20°C.
3. Se adicionó 200 µl del coctel de digestión y se mezcló pipeteando la suspensión.
4. Se incubó la mezcla a 55°C por 2h.
5. Se adicionó 200 µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamilico (25:24:1). Se mezcló por inversión por 2 min.
6. Se centrifugó a 15.000 rpm (aprox. 21 rcf) por 5 min.
7. Se transfirió aproximadamente 170 µl de la capa acuosa superior a un tubo limpio teniendo cuidado de no tomar nada de la interface.
8. Se adicionó 200 µl de cloroformo. Se mezcló por inversión por 2 min.
9. Se centrifugó a 15.000 rpm por 5 min y transfirió aproximadamente 150 µl de la capa acuosa superior a un tubo limpio teniendo cuidado de no tomar nada de la interface.

10. Se adicionó 300 µl de isopropanol al volumen transferido y se meció suavemente por 20 seg.
11. Se mantuvo en hielo por 15 min y luego se centrifugó a 15000 por 5 min. Se aspiró el sobrenadante y se volvió a centrifugar brevemente para coleccionar algún volumen residual de las paredes del tubo y se removió con un tip limpio.
12. Se permitió que el ADN se airee por 2 a 5 min y se re suspendió el precipitado en agua destilada estéril.
13. Se almacenó a -20 °C.

Se realizó la detección por PCR de ADN viral a partir del ADN extraído en todas las muestras utilizando el siguiente protocolo. Se realizaron tres pruebas de PCR para cada muestra, cada una con una dilución diferente del ADN extraído (dilución madre, 1/10 y 1/100).

Protocolo para amplificación por PCR del gen *lef8*

Se preparó la mezcla para PCR como sigue (sobre hielo). Se adicionó el agua primero y luego el resto de los componentes. Para un volumen de PCR final de 10 µl se agregó los siguientes componentes por muestra: 5,3 µl de agua libre de nucleasas, 1 µl de buffer, 0,3 µl de MgCl (25 mM), 0,2 µl de dNTPs (10 mM) (desoxirribonucleótidos trifosfatos), 1 µl de cebador/*lef8* F (forward), 1 µl de cebador/*lef8* R (reverse) y 0.2 µl de Taq polimerasa (5U/ µl).

Para lograr una mezcla de PCR homogénea se mezcló en un vortex y luego se centrifugó rápidamente. Se colocó 9 µl de la mezcla en cada tubo de PCR y 1 µl de molde (muestra de ADN a analizar). Los tubos se colocaron en el termociclador y se corrió el siguiente programa: Activación y desnaturalización Inicial de 4 min a 94 °C, desnaturalización de 10 seg a 92 °C, hibridación del cebador 20 seg a 45°C, elongación de la cadena 2 min a 72°C y por último una extensión final de 3 min a 72°C. Los pasos de 2 a 4 se repiten 35 ciclos.

Visualización de la amplificación

El producto de PCR se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa 1% y se tiñó con bromuro de etidio.

El control positivo utilizado para este análisis fue ADN extraído de larvas del mosquito *Culex quinquefasciatus* infectadas con CuniNPV el cual fue enviado por el Dr. J.J. Becnel (CMAVE).

Resultados

Sitio 1

Estados inmaduros de *Culex pipiens* fueron colectados desde septiembre de 2010 a enero de 2013 en cuatro zanjas domiciliarias. En cada muestreo, tres larvas de cuarto estadio fueron identificadas taxonómicamente como pertenecientes al complejo *C. pipiens*. El nematodo parásito fue identificado como *Strelkovimermis spiculatus*. Larvas de mosquito infectadas con MIV fueron observadas en 17 muestras (n=24), la prevalencia del virus se encontró en un rango de 0,09% a 31,6% (Tabla 1). *S. spiculatus* fue detectado en 82% (n=17) de las muestras positivas para MIV y en 42,8% (n=7) de las muestras negativas para este virus. La prevalencia del nematodo se encontró en un rango entre 0,1% y 94,5% (Tabla 1).

Se registraron larvas infectadas por MIV de todos los estadios, en todas las estaciones del año y en los cuatro sitios de muestreo. Normalmente las larvas infectadas presentaron coloración turquesa iridiscente, pero en ocasiones, en el sitio 1.3, se observaron en la misma muestra larvas que presentaban una coloración verdosa diferente a las otras.

El análisis estadístico demuestra que la presencia de MIV y de *S. spiculatus* esta significativamente asociada en las muestras de campo ($p=0,021$). La proporción de larvas infectadas con MIV fue positivamente correlacionada con la proporción de larvas infectadas con el nematodo ($r=0,59$, $p<0,01$). La prevalencia de *S. spiculatus* en larvas de campo disecadas, las cuales presentaban síntomas de MIV, fue de 47% en larvas de segundo estadio (n=15), 47% en larvas de tercer estadio (n=15) y 33% en larvas de cuarto estadio (n=15). Solo en 6 larvas de cuarto estadio infectadas con ambos patógenos se halló el nematodo como juvenil de último estadio (Fig. 6a) y en dos casos se comprobó la emergencia del mismo. La prevalencia de la infección con virus en pupas resultó muy baja, solo dos pupas infectadas fueron registradas en dos muestras diferentes (Fig. 6b). Larvas y pupas infectadas usualmente mueren pocos días después de ser colectadas.

Tabla 1. Muestreo de campo Sitio 1. Prevalencia (%) del nematodo y del iridovirus (MIV) en muestras de larvas de *Culex pipiens* de cuatro zanjas de drenaje diferentes en las ciudades de Berisso y La Plata, desde septiembre de 2010 a enero de 2013.

Fecha	Sitio	Prevalencia de MIV (n)	Prevalencia del nematodo(n)
21-09-10	1.1	2,00 (203)	85 (20)
20-10-10	1.1	1,18 (706)	4,2 (20)
13-04-11	1.2	0,16 (1873)	0 (50)
28-04-11	1.2	0,10 (4900)	0 (50)
10-05-11	1.2	0,09 (2287)	2 (50)
01-07-11	1.1	31,6 (38)	73 (26)
05-07-11	1.1	9,60 (104)	89 (80)
13-07-11	1.1	10,6 (142)	94,5 (128)
17-11-11	1.2	0,20 (3879)	6 (148)
08-03-12	1.3	6,66 (3000)	0,1 (100)
16-03-12	1.3	5,50 (2294)	0,2 (100)
10-04-12	1.3	5,10 (3260)	15,3 (72)
11-04-12	1.4	4,40 (250)	12 (50)
14-11-12	1.3	7 (287)	25 (60)
21-11-12	1.3	0,25 (1191)	2,08 (48)
04-01-13	1.3	6,95 (953)	1,31 (76)
25-01-13	1.3	0,5 (778)	0 (75)



Figura 6

Larva de *Culex pipiens* coinfectada con un virus iridiscente de mosquito (MIV) y el nematodo parásito *Strelkovimermis spiculatus* (a). Pupa de *Culex pipiens* infectada con MIV (b).

Sitio 2

A mediados de 2009, en muestreos preliminares a esta tesis, se halló una larva con sintomatología característica de la familia *Baculoviridae* en mosquitos. Luego de confirmarse la patología (ver Capítulo 2) se decidió conservar muestras de larvas del mismo sitio congeladas a -20°C para su posterior análisis molecular.

En la Tabla 2 se exponen las fechas de muestreo en donde se logró colectar larvas de mosquito en diferentes estadios. No se mencionan muestreos en donde el charco estaba seco o con presencia de agua pero sin estados inmaduros.

Se realizó la prospección molecular mediante PCR pero no fue posible detectar la presencia de baculovirus en ninguna de las muestras evaluadas.

Tabla 2. Muestreo de campo Sitio 2

Muestra N°	Fecha	Especie colectada	N° de larvas /eppendorf	N° de eppendorf
1	09/10/09	<i>Ochlerotatus crinifer</i>	50	5
1	09/10/09	<i>Ochlerotatus crinifer</i>	25	1
1	09/10/09	<i>Psorophora ferox</i>	21	1
2	10/10/09	<i>Ochlerotatus crinifer</i>	50	1
3	11/11/09	<i>Ochlerotatus crinifer</i>	23	1
4	16/09/10	<i>Ochlerotatus crinifer</i>	50	2
5	28/03/11	<i>Ochlerotatus crinifer</i>	50	2
5	28/03/11	<i>Psorophora ferox</i>	15	1
6	02/08/11	<i>Ochlerotatus crinifer</i>	50	2
7	18/8/11	<i>Ochlerotatus crinifer</i>	50	2
8	23/08/11	<i>Ochlerotatus crinifer</i>	50	2
9	30/08/11	<i>Ochlerotatus crinifer</i>	50	1
9	30/08/11	<i>Psorophora ferox</i>	50	1
10	27/09/11	<i>Ochlerotatus crinifer</i>	50	3
11	04/10/11	<i>Ochlerotatus crinifer</i>	50	4
12	06/12/11	<i>O. crinifer</i> y <i>P. ferox</i>	50	1
12	06/12/11	<i>Ochlerotatus crinifer</i>	50	2
13	20/12/11	<i>Ochlerotatus crinifer</i>	50	2
14	10/02/12	<i>O. crinifer</i> y <i>P. ferox</i>	50	2
14	10/02/12	<i>Ochlerotatus crinifer</i>	50	1
14	10/02/12	<i>Ochlerotatus crinifer</i>	48	1
15	15/02/12	<i>Psorophora ferox</i>	50	3
15	15/02/12	<i>Ochlerotatus crinifer</i>	50	3
16	29/02/12	<i>O. crinifer</i> y <i>P. ferox</i>	17	1
16	29/02/12	<i>Ochlerotatus crinifer</i>	50	1
17	29/03/12	<i>Ochlerotatus crinifer</i>	50	5
17	29/03/12	<i>Psorophora ferox</i>	50	1

Discusión

En estudios de campo del Sitio 1 se registraron infecciones mixtas entre el virus iridiscente de mosquitos y *Strelkovimermis spiculatus* en poblaciones naturales de individuos inmaduros de *Culex pipiens*. Los resultados de campo sugieren una asociación entre el parásito y el virus, en un sistema en el que el nematodo podría estar facilitando la entrada del virus a la larva durante la penetración del mismo. Solo en algunas larvas de campo infectadas con MIV fue registrada la presencia de juveniles tardíos del parásito y posterior emergencia del mismo, indicando que en alguna circunstancia el nematodo puede llegar a desarrollarse y emerger de una larva infectada con el virus. Las disecciones de las larvas infectadas con MIV provenientes de campo muestran que en menos del 50% de estas larvas se logró evidenciar la presencia de nematodo, esto sugiere que podría haber otras vías de entrada del virus al hospedador.

Hallazgos relacionados han sido reportados en otros sistemas patógeno-hospedadores. Mullens et al. (1999) reportó una asociación entre *Culicoides variipennis sonorensis* Wirth y Jones (Diptera), *Heleidomermis magnapapula* Poinar and Mullens (Nematoda) e *Iridoviridae* en sitios de cría naturales. También hay una mención de la presencia de *Corethrellonema grandispiculosus* Nickle (Nematoda) e *Iridoviridae* infectando *Corethrella brakeleyi* Coquillett (Diptera) en las mismas muestras de campo (Chapman et al., 1971). Más aun, en sistemas terrestres Poinar et al. (1980) observó isópodos infectados con ambos, el virus iridiscente y un parásito mermítido, el cual también se lo halló infectado con el iridovirus. A pesar de los estudios que se han realizado, todavía se encuentra pobremente esclarecido el ciclo de vida natural de esta familia de virus.

En el sitio 2 se registró solo una larva con sintomatología de baculovirus, siendo el primer registro de un virus de esta familia infectando larvas de mosquito en Argentina. Si bien fue confirmada la presencia del virus en la zona, no fue posible continuar con los estudios de transmisión debido a las dificultades que presenta la misma y la escasez de inóculo viral de partida.

Capítulo 2

Identificación de los virus hallados

Introducción

En el presente capítulo se describe el proceso de identificación de los virus patógenos de mosquitos hallados durante la prospección. La larva de *Aedes crinifer* con sintomatología de infección con un virus de la familia *Baculoviridae* hallada en Punta Lara, Ensenada, fue sometida a un examen directo mediante microscopia electrónica de transmisión (MET). A su vez, fue determinada la presencia de un virus de la familia *Iridoviridae* (MIV, por sus siglas en inglés, Mosquito Iridescent Virus) afectando larvas de *Culex pipiens* en poblaciones naturales, por sintomatología, métodos directos (MET) y moleculares (PCR).

Materiales y métodos

Identificación por sintomatología

Se observaron las larvas infectadas bajo lupa binocular (ver capítulo 1).

Identificación por observación directa con Microscopio Electrónico de Transmisión (MET).

Tres larvas de *Culex pipiens* infectadas con MIV y la larva de *Ochlerotatus crinifer* infectada con baculovirus fueron tratadas para microscopia electrónica siguiendo la técnica descrita por Becnel (1997) y detallada a continuación.

Protocolo general para microscopía electrónica de transmisión (MET)

Fijación

El primer paso es la fijación de las muestras, para ello se colocaron en glutaraldehído 2,5%. Luego de 20 minutos en el fijador, los ejemplares fueron cortados en piezas menores para asegurar la infiltración del fijador en los tejidos. Se transfirieron las piezas a glutaraldehído fresco y se fijaron por un total de 2 horas. Se lavaron en buffer cacodilato de sodio 0,1 M (pH 7,2-7,4) 3 veces (1min cada vez), se postfijaron en tetróxido de osmio 1% (pH 7,5) por 1 hora 45min a 2 horas. Se lavaron 3 veces, 15min cada vez, en agua bidestilada. Luego de la fijación se deshidrata o conserva en una solución buffer de sacarosa toda la noche.

Deshidratación

Se procedió a la deshidratación manteniendo la muestra 10 min en cada concentración de etanol 10%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, y 100%. Luego se sumergió en acetona 100% dos veces de 15 min cada una y se procedió a la inclusión en resina.

Infiltración e inclusión

Se procedió de la siguiente manera. Las muestras se colocaron en 25% resina y 75% de acetona durante toda la noche. Al día siguiente se colocaron en 50% resina y 50%

acetona durante 4 horas, luego 25% resina y 75% acetona durante 4 horas y se mantuvieron durante toda la noche en resina pura. Al día siguiente se transfirieron nuevamente a resina pura en un frasco limpio y se mantuvieron en ella todo el día o más de 6 horas. Luego de esto se incluyó cada pieza de la muestra en cápsulas con resina pura y fresca. Las cápsulas se deshidrataron previamente durante 24 horas o más en una estufa a 60 °C. Para finalizar el proceso se colocaron las cápsulas con el material incluido 24 horas en estufa a 60 °C. Los tacos de resina fueron procesados por el servicio de microscopia de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. Los cortes ultrafinos (60nm) se contrastaron con 2% de acetato de uranilo y citrato de plomo y fueron examinados con un microscopio electrónico de transmisión a 75 kv.

Identificación Molecular del Iridovirus

Amplificación por PCR de una región conservada de la proteína mayor de la cápside (Major capsid protein, MCP)

Las partículas virales de dos larvas infectadas fueron parcialmente purificadas para la extracción de ADN. Las larvas fueron homogenizadas en agua destilada, filtradas a través de una jeringa con algodón y centrifugadas dos veces para remover los restos celulares (1000 rpm por 10 min). El sobrenadante fue centrifugado a 15000 rpm por 30 min. Finalmente el precipitado fue re-suspendido en 500µl de agua destilada; 100 µl de esta suspensión de partículas de MIV fue digerida con proteinasa K (0.1 mg/ml) en buffer de lisis con SDS (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0; NaCl 200 mM; EDTA 1mM, pH 8.0; SDS 0.5%). La mezcla fue incubada a 37°C por 3 hs y centrifugada a 16000g por 15 min. El ADN viral fue purificado mediante extracción estándar con fenol/cloroformo y precipitación con etanol (Sambrook et al., 1989). El pellet final fue disuelto en 20µl de agua bidestilada.

Se usaron los cebadores MIV_Univ_R(5'-CRATRGCRTARTTRGCCCATAC-3') y MIV_Univ_F(5'-CGNAWWGGRTAYGAYAAYATGATTGG -3') para la amplificación de una región conservada del gen de la MCP (diseñado en el laboratorio de J.J. Becnel en el CMAVE) a partir de 1 µl de ADN de MIV (disolución 1/100) como molde. La amplificación con Taq Polimerasa (Invitrogen) fue llevada a cabo bajo condiciones

estándar (buffer estándar 1X, 0.25 U de Taq ADN polimerasa, MgCl_2 1.5 mM, BSA 1 mg/ml, 0.2 mM por cada dNTP y 1 μM por cada primer). Se usó el siguiente protocolo de amplificación: desnaturalización inicial de 1 min a 94°C, 35 ciclos de 10 seg. a 94°C, 10 seg. a 56°C y 20 seg. a 72°C seguido de la extensión final de 3 min a 72°C. Se realizó electroforesis en gel de agarosa 1% para visualizar el producto de PCR mediante tinción con bromuro de etidio. El tamaño esperado de la banda es de aproximadamente 320 pb.

Secuenciación del producto de PCR y estudios de filogenia del MIV hallado.

Secuenciación

El fragmento obtenido en la amplificación se cortó y se recuperó utilizando una matriz de adsorción (GENECLEAN II Kit, BIO 101). El fragmento purificado fue ligado al vector pGEM-T (Promega) y electroporado en células Top 10 competentes de *Escherichia coli*. Luego de la selección en placas de agar LB conteniendo 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ampicilina y 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de X-gal, los clones recombinantes se cultivaron en LB líquido con ampicilina. Los plásmidos de ADN fueron purificados usando el método de lisis alcalina (Sambrook et al., 1989) y secuenciados en MacroGen Center (Corea) empleando los cebadores universales T7 y SP6.

Estudios de la filogenia

La secuencia proteica, traducida in silico, fue comparada con las secuencias correspondientes al miembro tipo de cada género de la familia Iridoviridae usando el programa ClustalX para generar un alineamiento múltiple (Thompson et al., 2002). Se utilizó el programa MEGA4 software para inferir la filogenia del grupo comparado usando el Método de Evolución Mínima (Tamura et al., 2007). Las distancias evolutivas que se usaron para inferir el árbol filogenético fueron computadas usando los siguientes parámetros: Modelo [aminoácidos con corrección de Poisson], Sustituciones a incluir [Todas], Patrón entre Linajes [Igual (homogéneo)], Velocidad entre Sitios Diferente (con Distribución Gamma)] y parámetro Gamma [2.25].

Resultados

Identificación por sintomatología

Baculoviridae

Se observaron núcleos hipertrofiados en las células del tubo digestivo medio de una larva de mosquito de tercer estadio temprano de la especie *Aedes crinifer*.

Iridoviridae

Se observó una coloración turquesa iridiscente en todo el cuerpo de tres larvas de cuarto estadio de *Culex pipiens*. En muestreos posteriores, en el Sitio 1.3 también se hallaron larvas con coloración verdosa iridiscente.

Identificación por observación directa con Microscopio Electrónico de Transmisión (MET).

Mediante microscopía electrónica de transmisión y realizando el proceso antes descrito, se pudo comprobar la presencia de cuerpos de oclusión con partículas virales situadas en los núcleos de las células del intestino medio de una larva de mosquito de la especie *A. crinifer* recolectada en el Sitio 2 a mediados del año 2009. La ubicación y características de estas partículas son coincidentes con el género *Deltabaculovirus* de la familia *Baculoviridae* (Fig. 1a y 1b).

Por otra parte, se comprobó mediante este estudio, la presencia de partículas virales de forma icosaédrica acumuladas en el citoplasma celular de larvas de *C. pipiens* del Sitio 1.1 (Fig.2), dichas características son coincidentes con la familia *Iridoviridae*.

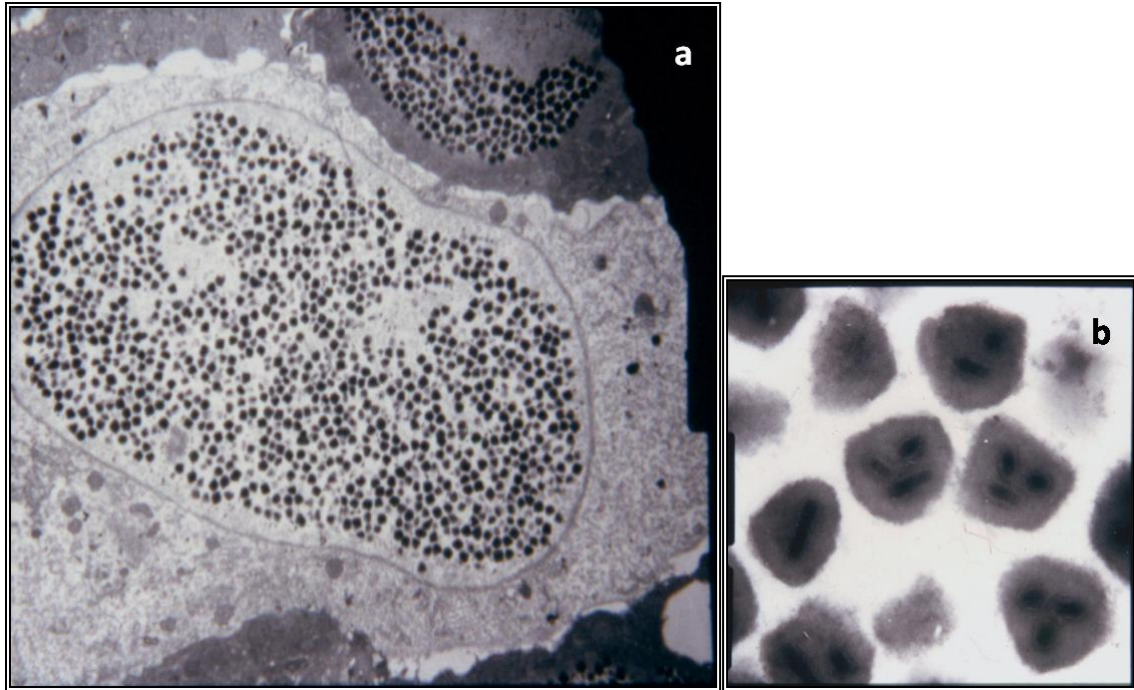


Figura 1. *Baculoviridae*. Microscopia electrónica de transmisión (MET). Sección ultrafina de una larva infectada de *Aedes crinifer*, se observa un núcleo celular repleto de partículas virales (a), cuerpos de oclusión dentro de los cuales se observan los viriones (b).

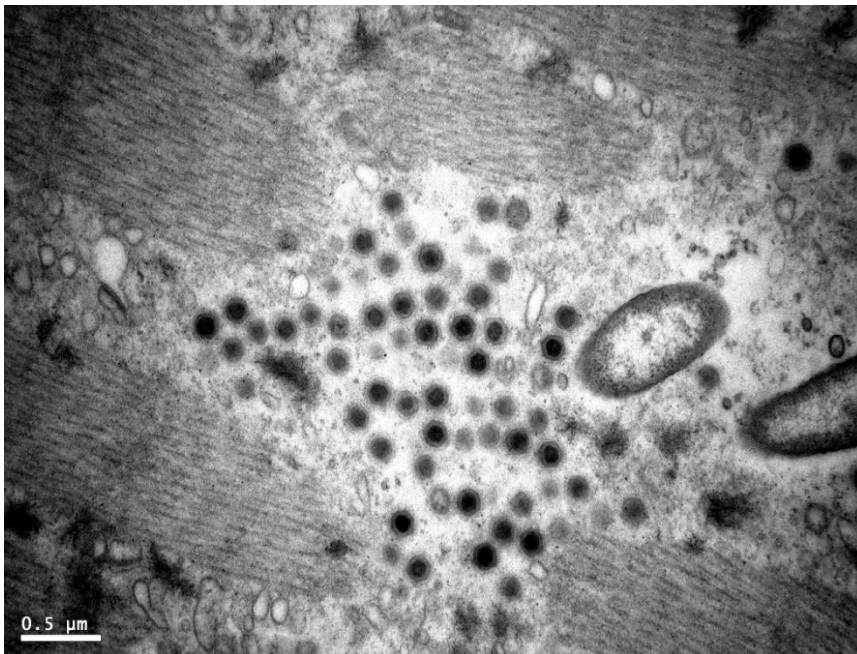


Fig. 2. *Iridoviridae*. Microscopia electrónica de transmisión (MET). Sección ultrafina de una larva infectada de *Culex pipiens* donde se observan las partículas de un virus iridiscente de mosquito acumuladas en el citoplasma celular.

Identificación Molecular

El virus hallado en larvas de *C. pipiens* en el Sitio 1.1 fue identificado por PCR mediante la amplificación de un fragmento conservado del gen que codifica para la proteína mayor de la cápside (MCP), mediante la cual se obtuvo el fragmento esperado de aproximadamente 300 pares de bases (Fig.3).

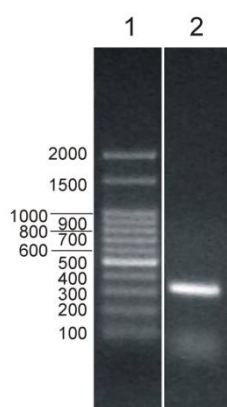


Figura 3. Gel de agarosa. Producto de la amplificación de una región conservada del gen de la proteína MCP visualizado en gel de agarosa. En calle 2 se observa una banda de aproximadamente 300 pb.

Análisis de las secuencias

En la figura 4 se observa el alineamiento múltiple de la secuencia deducida de la proteína mayor de la cápside del virus iridiscente de *Culex pipiens* y la correspondiente secuencia de los miembros tipo de diferentes géneros dentro de la familia *Iridoviridae*. La identidad por parejas y la homología entre todas las secuencias proteicas analizadas se muestran en la figura 5. El análisis filogenético de estos resultados muestra que la secuencia parcial de la proteína MCP de MIV en *C. pipiens* se agrupa más cercanamente con IIV-22 de *Simulium sp.* y miembros del género *Chloriridovirus*, especialmente IIV-3 de *Aedes taeniorhynchus* que con el resto de los géneros de la familia comparados (Fig. 6)

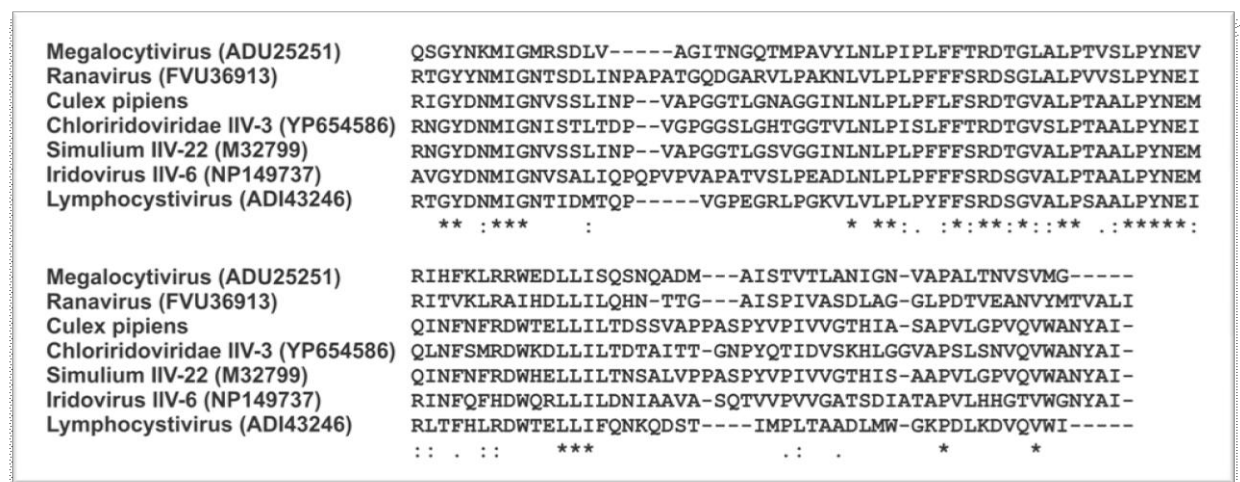


Figura 4. Alineamiento múltiple de la secuencia deducida de la proteína mayor de la cápside del virus iridiscente de *Culex pipiens* y la correspondiente secuencia de los miembros tipo de diferentes géneros dentro de la familia *Iridoviridae*.

	<i>Culex pipiens</i>	<i>Simulium</i> IIV-22 (M32799)	<i>Chloriridovirus</i> IIV-3 (YP654586)	<i>Iridovirus</i> IIV-6 (NP149737)	<i>Lymphocystivirus</i> (ADI43246)	<i>Megalocytivirus</i> (ADU25251)	<i>Ranavirus</i> (FVU36913)
<i>Culex pipiens</i>		90.1	61.6	60.7	47.7	37.8	41.2
<i>Simulium</i> IIV-22 (M32799)	98.2		63.4	60.5	48.6	39.68	43.0
<i>Chloriridovirus</i> IIV-3 (YP654586)	90.2	91.1		44.2	49.5	40.5	36.8
<i>Iridovirus</i> IIV-6 (NP149737)	78.6	79.8	73.5		46.9	36.3	42.6
<i>Lymphocystivirus</i> (ADI43246)	71.2	70.3	71.2	69.9		41.6	50.0
<i>Megalocytivirus</i> (ADU25251)	69.4	70.3	73.0	65.5	70.3		42.3
<i>Ranavirus</i> (FVU36913)	71.9	74.6	71.9	72.2	74.5	70.3	

Figura 5. Se muestra la identidad por parejas (triángulo superior derecho) y la homología (triángulo inferior izquierdo) entre todas las secuencias proteicas de los miembros tipo de diferentes géneros dentro de la familia *Iridoviridae*.

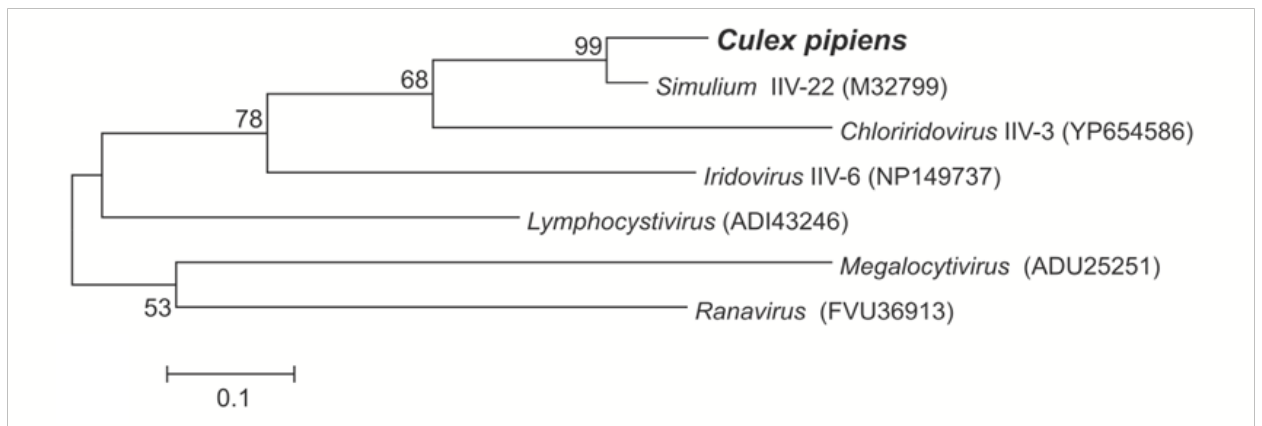


Figura 6. Relación evolutiva de los siete taxa inferida usando el método de la evolución mínima. El nodo de consistencia (test de bootstrap, 1000 réplicas) se muestra junto a cada rama. El árbol está dibujado a escala con el largo de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas que se usaron para inferir el árbol filogenético.

Discusión

Se logró identificar dos entomovirus que se encontraban afectando distintas especies de mosquitos en la provincia de Buenos Aires, Argentina. Se halló un baculovirus que correspondería al género *Deltabaculovirus* en *Aedes crinifer*, el cual no pudo ser replicado, y un iridovirus presuntamente perteneciente al género *Chloriridovirus*. En la figura 6 se observa la relación evolutiva de 7 taxa de la familia *Iridoviridae*. Como se puede ver en la misma, la consistencia de tres de los nodos es relativamente baja. Podemos suponer que, el motivo de esta circunstancia, es que la secuencia genética analizada con la que se estudió la filogenia es un pequeño fragmento de un gen bien conservado dentro de la familia *Iridoviridae*. El análisis filogenético mostró que el IIV de *Culex pipiens* aunque está agrupado con el IIV-3 (especie tipo de *Chloriridovirus*) es más cercano al IIV-22 (*Simulium sp.*). Esta situación es coincidente con lo descripto por Delhon et al. (2006) en un trabajo sobre el IIV-3 donde se muestra un cladograma basado en una cadena de once alineamientos proteicos conservados, en donde los iridovirus de invertebrados están claramente separados de los iridovirus de vertebrados. Estos autores también realizaron un análisis filogenético de la secuencia completa de la proteína MCP (Fig.7) y encontraron que IIV-3 (de mosquitos) y el IIV-6 (de lepidópteros) están claramente separados entre sí y que el IIV-3 aunque posee características únicas, es más cercano a un grupo que incluye el IIV-22 (Simúlidos) que al IIV-6 (especie tipo del género *Iridovirus*).

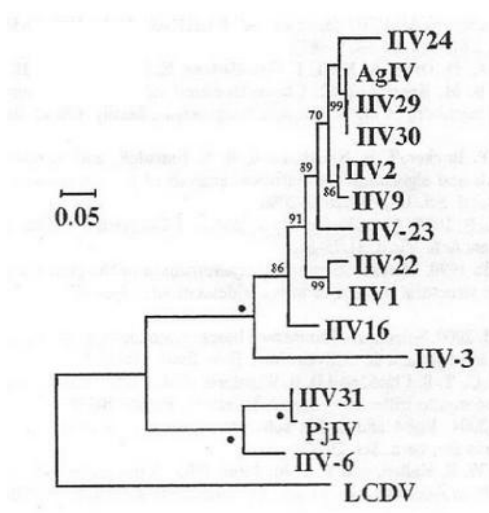


Figura 7. Cladograma realizado a partir del análisis filogenético de la secuencia completa de la Proteína Mayor de la Cápside de iridovirus de invertebrados (IIV). Delhon et al., 2006.

Notablemente, el grupo hermano del IIV-3, que incluye el IIV-22, también agrupa una especie miembro del género *Iridovirus* (IIV-1) y otros virus relacionados que todavía no han sido aprobados como especies del mismo género (IIV-9, IIV-16). Dado que estos virus están más cercanos al IIV-3 cuando deberían estar agrupados con el IIV-6, Delhon et al. (2006) proponen que se debe poner en orden la taxonomía del grupo. Es claro en este análisis que el IIV de *C. pipiens* es más cercano al IIV-3 (especie tipo para el género *Chloriridovirus*) que al IIV-6 (especie tipo para el género *Iridovirus*).

Este reporte constituye la primera documentación mundial de un virus iridiscente en larvas de *Culex pipiens*, y es también la primera vez que un virus iridiscente ha sido descrito infectando mosquitos en la Región Neotropical.

Nuestro registro de un baculovirus en *Aedes crinifer* constituye uno de los escasos reportes en mosquitos en el mundo y el único en Argentina.

Capítulo 3

Transmisión Horizontal del Iridovirus

Introducción

Se han realizado variados estudios con el fin de dilucidar las vías de transmisión de los iridovirus de invertebrados. Algunos autores demostraron la transmisión por canibalismo en distintas especies. Larvas sanas del lepidóptero *Spodoptera frugiperda* (Smith) desarrollaron síntomas de la enfermedad un tiempo después de ingerir cadáveres infectados de sus congéneres (prevalencia=92 %) (Williams y Hernandez, 2006). Resultados similares fueron obtenidos con anterioridad en un estudio con larvas de *Tipula oleracea* L. (Carter, 1973). Se ha visto también que parásitos y parasitoides pueden transmitir el virus a un huésped susceptible y sano durante la penetración, como es el caso del mermítido *Heleidomermis magnapapula* a larvas del jején *Culicoides variipennis sonorensis* (Mullens et al., 1999) o durante la oviposición del ichneumonido endoparasitoide *Eiphosoma vitticolle* (Cresson, 1865), en cuyo caso se vio que todas las hembras transmiten el virus a un hospedador sano luego de haber picado una larva infectada (Lopez et al., 2002). En cuanto a los virus iridiscentes de mosquitos algunos autores propusieron que no tiene medios activos para entrar a la larva por lo que lo hace a través de injurias en la barrera primaria, ya sea la cutícula externa o la matriz peritrófica. Esto quedó demostrado en un estudio en el cual se agregó al agua del criadero, fibras de carburo de silicio en presencia del virus; obteniéndose niveles de infección mayores (17.5 ± 5.3 %) que en presencia del virus solo (4 ± 3.1 %) (Undeen y Fukuda, 1994). En otro estudio en el que se utilizó microscopía electrónica se vio que casi todas las partículas virales ingeridas por las larvas de primero y segundo estadio de *Aedes taeniorhynchus* eran degradadas rápidamente luego de entrar al intestino medio siendo incapaces de penetrar en la matriz peritrófica e infectar al individuo por medios propios (Stoltz y Summers, 1971). En este capítulo se exponen los ensayos realizados con el objetivo de mejorar la comprensión de los mecanismos de entrada del virus a la larva de *Culex pipiens* así como la influencia de algunos factores en la transmisión viral.

Materiales y métodos

Obtención de mosquitos y nematodos

Las larvas de mosquito y los nematodos utilizados durante los ensayos fueron obtenidos de las colonias de *Culex pipiens* y *Strelkovimermis spiculatus* mantenidas en el CEPAVE para tal fin (ver Apéndices 1 y 2).

Obtención de virus

Purificación y cálculo del equivalente larval.

Inicialmente se pensó en utilizar como inóculo para los ensayos, el virus purificado. Con el objetivo de calcular el equivalente larval, o sea, el número aproximado de partículas virales que contiene una larva con infección evidente en todo el cuerpo, se procedió a la purificación del virus en gradiente de sacarosa y posterior conteo de partículas utilizando un método directo como es mediante Microscopia Electrónica. Los protocolos existentes describían una metodología en la que se utilizaba microscopio electrónico de barrido. Tras realizarse algunas pruebas con diferentes equipos de distintos Centros de investigación en La Plata y al no poder visualizar las partículas con la claridad esperada se procedió a la modificación del protocolo para ser usado con Microscopia Electrónica de Transmisión.

Protocolo de Purificación de partículas virales

Se realizaron dos purificaciones, una a partir de 130 larvas infectadas y otra a partir de 204 larvas infectadas. En cada caso, el número conocido de larvas infectadas de tercer estadio se homogenizaron en agua destilada con homogeneizador de vidrio. La suspensión se filtró con una jeringa con un algodón en su interior para separar los restos de cutícula. El filtrado se centrifugó a 2500 rpm por 15 minutos para descartar restos celulares grandes. El sobrenadante se centrifugó a 15000 rpm por 30 min. El precipitado se resuspendió en agua, se sembró en un gradiente de sacarosa 15-60 % w/v y se centrifugó a 12000 rpm por 20 min.

Para formar el gradiente de sacarosa entre 15 y 60% se colocó en cada tubo de centrifuga aproximadamente 900 microlitros de la solución de sacarosa más diluida y por debajo, con mucho cuidado para que no se mezclen las fases, se colocó la más concentrada. Los tubos fueron colocados en posición horizontal (Fig. 1) durante dos horas para que se forme el gradiente, luego se los colocó en posición vertical lentamente.

Luego de la centrifugación del homogenato a través del gradiente, la banda del virus (Fig. 2) se separó, resuspendió en agua destilada y se centrifugó a 30000 rpm por 30 min para eliminar la sacarosa, el precipitado azul obtenido (Fig. 3) se re suspendió en agua destilada. Este purificado tuvo que ser lavado dos veces para eliminar los cristales de la sacarosa que obstaculizan la visualización al MET. Se re-suspendió en buffer fosfato. Para el proceso de pre-purificado se utilizó una centrifuga de mesa y para la centrifugación a través del gradiente de sacarosa y los lavados posteriores se utilizó una ultracentrífuga Centricom, con rotor swingins-Bucket.

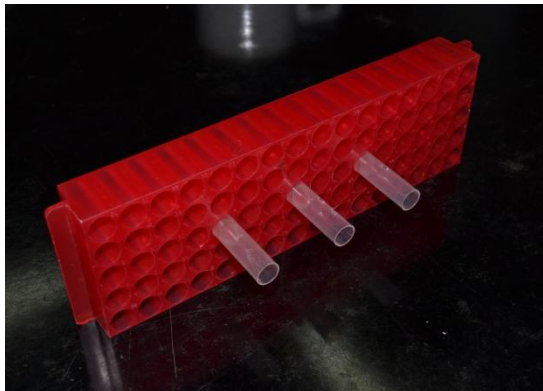


Figura 1. Armado del gradiente de sacarosa. Se colocaron dos concentraciones diferentes de sacarosa, 60% arriba y 15% abajo, se colocaron los tubos en posición horizontal para que se forme el gradiente.

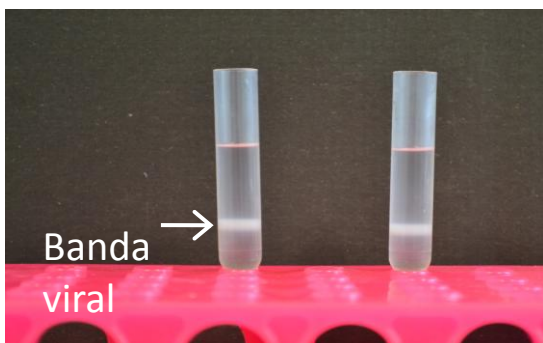


Figura 2. Banda viral. Se observa la banda formada por el virus en el gradiente de sacarosa luego de la ultracentrifugación.

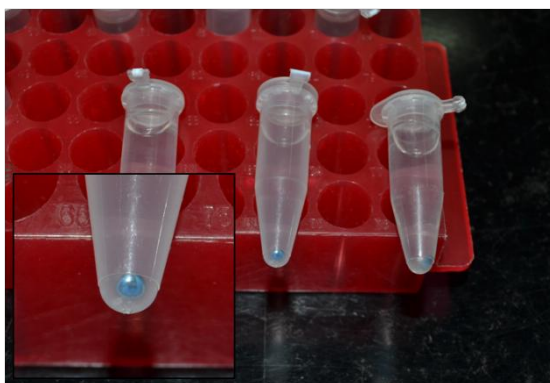


Figura 3. Virus precipitado. Se observa en el fondo de los tubos el virus purificado y precipitado color turquesa iridiscente.

Protocolo de Cuantificación de partículas virales

Las partículas virales fueron cuantificadas en base a la metodología general descrita por Constantino et al. (2001), con algunas modificaciones dado que no se utilizó microscopía electrónica de barrido sino de transmisión. Alícuotas de 10 μl de cada suspensión viral fue mezclada con 10 μl de suspensión de bolitas de polietileno de 460 nm de diámetro (Sigma-Aldrich) en una concentración conocida de $1,8 \times 10^9$ b/ml. Esta mezcla fue diluida una parte en cien con el objetivo de obtener una proporción cercana a 1:1 (bolitas: partícula viral), para lo cual se realizaron observaciones previas en el TEM (Fig. 4). Se depositaron 2 μl de la suspensión diluida sobre una grilla de observación del TEM y se aguardó a su secado. Se examinaron nueve cuadrados de esta grilla bajo TEM y se registró el número total de partículas virales y de bolitas para luego calcular la proporción virus: bolita. El número de partículas virales por larva fue calculado en base al número total de partículas virales en la suspensión madre. Este procedimiento fue realizado dos veces.

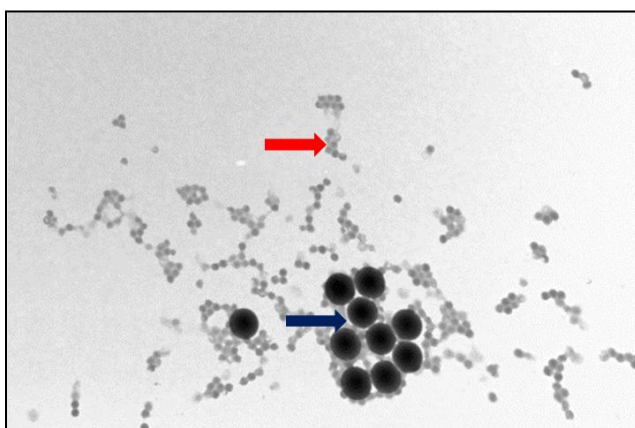


Figura 4. Fotografía obtenida con microscopía electrónica de transmisión con el fin de estimar el número de partículas virales en la suspensión madre y calcular el equivalente larval. Se observan las partículas virales (flecha roja) y las bolitas de polietileno de concentración conocida (flecha azul).

Inóculo

Luego de la purificación se realizaron ensayos preliminares para evaluar la virulencia del virus purificado. Se realizaron pruebas utilizando entre 0.7 y 3 equivalentes larvales por recipiente de 150 ml de agua y 20 larvas de *C. pipiens*. Como resultado se obtuvo en promedio una prevalencia de la infección del 16 % a las 72 horas. Dado que la infección resultó considerablemente menor utilizando el virus purificado que utilizando la larva entera homogenizada, como se vio en los estudios preliminares, se procedió a utilizar larvas infectadas como inóculo para realizar los ensayos. Para obtener larvas inóculo se realizaron infecciones exponiendo 100 larvas de 72 horas de vida a tres larvas de tercer estadio infectadas con iridovirus y 500 J2 de *S. spiculatus* en 100 ml de agua por 96 horas en incubadora a 25 ± 1 °C. Las larvas de tercer estadio visiblemente infectadas en todo el cuerpo fueron seleccionadas y almacenadas en agua destilada a $\approx -20^\circ\text{C}$ hasta ser utilizadas. El inóculo se administró previamente homogenizado con un embolo plástico dentro de un tubo eppendorf de 1,5 ml con agua destilada.

Ensayos

1. Transmisión *per os*

- Metodología general
- Susceptibilidad de los distintos estadios larvales
- Susceptibilidad de las larvas de segundo estadio en cantidades crecientes de inóculo

2. Transmisión a través de lesiones en la cutícula y tubo digestivo

- Tierra de diatomeas
- Densidad larval alta
- Agitación con arena gruesa

3. Transmisión vehiculizada por el nematodo *Strelkovimermis spiculatus*

- Metodología general
- J2: larva de mosquito
- Estadio de la larva
- Cantidad de inóculo

1. Transmisión *Per os*

Metodología general

Se expusieron 100 larvas sanas de *C. pipiens* al inóculo viral correspondiente, por 24 horas, en contenedores de plástico de 300 ml con 200 ml de agua destilada. Luego, las larvas fueron enjuagadas en agua destilada y transferidas a bandejas plásticas de dos litros de capacidad con agua de clorinada y alimento balanceado para cobayo finamente molido. El ensayo fue evaluado a las 72 horas luego de la exposición, que es el período de tiempo aproximado luego del cual las larvas infectadas muestran una coloración turquesa iridiscente. Las larvas fueron observadas bajo lupa binocular sobre un fondo negro y fue registrado el número de larvas vivas e infectadas. Todos los ensayos fueron llevados a cabo a 25 ± 1 °C y un fotoperíodo (Luz: Oscuridad) 12:12. Los controles realizados son descritos en cada caso.

Susceptibilidad de los distintos estadios larvales

Se expusieron 100 larvas sanas de *C. pipiens* de cada uno de los estadios a tres larvas infectadas homogenizadas. Se realizaron controles con 100 larvas de cada estadio sin el agregado del patógeno. Se realizó una réplica por vez, en tres tiempos diferentes.

Susceptibilidad de las larvas de segundo estadio en cantidades crecientes de inóculo

Se expusieron 100 larvas sanas de segundo estadio de *C. pipiens* a cantidades crecientes de inóculo: 6, 12 y 18 larvas infectadas. Se realizó un control con larvas de segundo estadio. Se realizó una réplica por vez en dos tiempos diferentes.

2. Transmisión por laceración de la cutícula y tubo digestivo

Se realizaron estudios preliminares en los que se probaron diferentes formas de generar lesiones en la cutícula y el tubo digestivo con el objeto de generar vías de ingreso del virus a la larva.

Tierra de diatomeas

Dada la naturaleza altamente abrasiva, se utilizó tierra de diatomeas como forma de laceración de la cutícula larval y el tubo digestivo al ser ingerida. En un ensayo previo

se determinó la cantidad de tierra factible de ser usada sin obtener una alta mortalidad larval; se realizó en seis recipientes de 300 ml con agua de clorinada con 15 larvas de segundo estadio de *C. pipiens* en cada uno y las cantidades de tierra de diatomeas utilizadas fueron las siguientes: 500 mg, 100 mg, 80 mg, 50 mg, 30 mg y 10 mg. Se seleccionaron cuatro cantidades: 20 mg, 30 mg, 40 mg y 50 mg. El ensayo se realizó en recipientes de 300 ml de capacidad con 100 ml de agua destilada en donde se colocó la tierra de diatomeas correspondiente, 100 larvas de segundo estadio de *C. pipiens* y tres larvas de tercer estadio infectadas y homogenizadas como inóculo. Luego de 24 horas se traspasó el líquido a una bandeja plástica y se completó el contenido a dos litros de agua, se evaluó el ensayo a las 72 horas. Se realizaron controles con larvas y la correspondiente cantidad de tierra de diatomeas y un control con larvas solas.

Densidad poblacional alta

Se realizó un ensayo en el cual se utilizó la sobrepoblación de larvas (altas densidades larvarias) como método para producir injurias debido al roce entre las mismas. Dado que esta situación se da naturalmente en el campo, la pérdida de setas u otro tipo de daño podrían ser la vía de entrada al virus. En 35 ml de agua destilada se colocaron 500 L2 y dado es el pequeño volumen utilizado solo se inculó con una larva infectada homogenizada, a las 24 horas se traspasó a una bandeja con dos litros de agua, se evaluó a las 72 horas. El ensayo se realizó dos veces.

Agitación con arena gruesa

En un erlenmeyer de 500 ml de capacidad se colocó 120 ml de agua, 100 larvas de *C. pipiens* de segundo estadio tardío y cinco larvas infectadas de la misma especie. Se agitó con agitador magnético por 5 minutos a velocidad mínima y se dejó en ese recipiente durante 24 horas. Las larvas sobrevivientes se traspasaron a un recipiente con 500 ml de agua y comida. Se evaluó el ensayo a las 72 horas. El ensayo se repitió dos veces.

3. Transmisión mediada por el nematodo *Strelkovimermis spiculatus*

Metodología general

Se expusieron 20 larvas sanas de *C. pipiens* al inóculo viral correspondiente y J2 de *S. spiculatus* por 24 horas en contenedores de plástico de 30 ml con 25 ml de agua destilada. Luego, las larvas fueron enjuagadas en agua destilada y transferidas a contenedores plásticos de 200 ml con 150 ml de agua destilada y alimento balanceado para cobayo finamente molido. El ensayo fue evaluado a las 72 horas luego de la exposición. Las larvas fueron observadas bajo lupa binocular sobre un fondo negro y fue registrado el número de larvas vivas e infectadas. Todos los ensayos fueron llevados a cabo a 25 ± 1 °C y un fotoperiodo (L: O) 12:12. Los controles realizados son descritos en cada caso. Cada ensayo fue realizado por triplicado y repetido tres veces en el tiempo.

Tres factores fueron evaluados en relación con la transmisión mediada por el nematodo: la proporción J2: mosquito larva, el estadio de la larva de mosquito y la cantidad de inóculo utilizado.

Dado que esta serie de ensayos fue realizada en un volumen mucho menor que los ensayos de transmisión per os, se utilizó como inóculo solo una larva infectada, a excepción del ensayo en donde el inóculo fue variable.

J2: larva de mosquito

Para estudiar la influencia que tiene la proporción de *pre-parásitos: larvas de mosquito* en la prevalencia de la infección con MIV se evaluaron cuatro proporciones, a saber: 1:1, 3:1, 5:1 y 7:1 (J2: L). Se utilizó una larva infectada con MIV como inóculo. Se realizaron tres controles: se expusieron larvas sanas al virus (una larva infectada homogenizada), a las diferentes proporciones de J2 y se criaron larvas sanas sin ningún patógeno.

Estadio de la larva

Con la finalidad de evaluar la susceptibilidad de los distintos estadios a la infección del virus mediada por el nematodo, cada estadio fue expuesto a una larva infectada como inóculo y J2 en proporción 5:1 (J2: L). Esta proporción fue seleccionada para obtener

un nivel de parasitismo alto con el menor número de pre-parásitos. Para cada estadio se realizaron tres controles, en uno las larvas se expusieron al virus, en el segundo las larvas se expusieron al nematodo (5:1), y por último las larvas fueron criadas sin patógenos.

Cantidad de inóculo

Se decidió utilizar como inóculo media, una, tres y seis larvas infectadas. Para usar media larva, una larva infectada fue homogenizada en 500 µl de agua destilada y 250 µl de este homogenato fue utilizado como inóculo. Se realizaron tres controles, un control con larvas expuestas a cada inóculo, larvas de mosquito expuestas al nematodo (5:1) y larvas criadas sin presencia de patógenos.

Inóculo diluido

Para este ensayo se realizó un diseño experimental similar a la serie anterior pero todo el ensayo se llevó a cabo en un volumen 80 veces mayor. Esta dilución equivale a tener en 25 ml de esa dilución 0.0125 partes de una larva infectada ($7,3 \times 10^6$ partículas virales). El ensayo fue llevado a cabo en su totalidad en baldes plásticos de 23.5 cm de diámetro en los que se colocaron: dos litros de agua, una larva infectada homogenizada, 20 larvas de *C. pipiens* sanas y 100 J2 (5:1). Se realizaron dos controles, un control con larvas sanas y uno con 20 larvas sanas y 100 J2. Se realizó por triplicado y tres veces en el tiempo. Se evaluaron a las 72 horas.

Análisis estadísticos

La prevalencia de la infección con MIV fue calculada en todos los ensayos a partir del número total de larvas vivas. El número de larvas infectadas con MIV y el número de larvas vivas fue sujeto al análisis de la varianza (ANOVA). Cuando los resultados fueron significantes ($p < 0.05$), se utilizó Tukey's HORASD (método: 95.0%) para múltiples comparaciones entre tratamientos.

Resultados

Cuantificación viral y equivalente larval

En ambas cuantificaciones fue obtenida una concentración de partículas virales por larva del orden de 10^8 .

Nº promedio de partículas por larva = **Equivalente larval $\approx 5,85 \times 10^8$**

Ensayos

1. Transmisión *per os*

Estadio de la larva

La prevalencia de la infección con MIV en larvas de segundo estadio fue 0,37% (n=300). No se obtuvo infección en larvas de primero, tercero y cuarto estadio y solo una larva correspondiente al segundo estadio se halló infectada (tabla 1). La mortalidad en los controles varió aleatoriamente entre 2 y 44 %.

Tabla 1.

Resultados de los ensayos de transmisión *per os* en distintos estadios larvales con tres larvas infectadas como inóculo.

Estadio Larval	Nº de larvas expuestas (Total)	Nº de larvas vivas (promedio entre réplicas)±DS	Nº de larvas infectadas (promedio entre réplicas)±DS
1ro	300	93 ± 4	0
2do	300	81 ± 24,3	0,3 ±0,7
3ro	300	79 ± 29,6	0
4to	300	82 ± 14,4	0

Cantidad de inóculo

La prevalencia de la infección con MIV fue 0,7% (n=200) en el ensayo cuyo inóculo fue 6 larvas infectadas. No se logró infectar mayor cantidad de larvas sanas incrementando la cantidad de inóculo. La mortalidad en los controles no superó la mortalidad en los ensayos (Tabla 2).

Tabla 2.

Resultados de los ensayos de transmisión *per os* en larvas de segundo estadio y con diferentes cantidades de inóculo.

Inóculo	Nº de larvas expuestas a MIV (Total)	Nº de larvas vivas (promedio entre réplicas)±DS	Nº de larvas infectadas con MIV(promedio entre réplicas)±DS
6 Li	200	70 ± 26,8	0,5 ± 0,7
12 Li	200	85,5±3,5	0
18 Li	200	87± 1,4	0

2. Transmisión por laceración de la cutícula y el tubo digestivo

En ninguno de los tres ensayos de transmisión por laceración de la cutícula fue posible infectar larvas sanas. En el ensayo con tierra de diatomeas la mortalidad más alta fue 34% en el recipiente con mayor concentración de tierra confirmando el daño producido por la misma. En el recipiente con menor concentración, la mortalidad fue 28% mientras que en los controles no superó el 23 %. En los ensayos con alta densidad larval y arena gruesa tampoco se obtuvieron resultados positivos.

3. Transmisión mediada por el nematodo

J2: larva de mosquito

Cuando larvas de 72 horas de eclosionadas fueron expuestas al virus y a diferentes proporciones de pre-parásitos, la prevalencia de MIV se incrementó desde 38% (n=180) con la proporción más baja (1:1) a 88.3 % (n=180) con la proporción más alta (7:1) (Fig.6). Las diferencias en el número de larvas infectadas entre las distintas proporciones fue altamente significativo (F=12,78, df=3, p< 0.01) excepto por los pares

3:1-5:1 y 5:1-7:1 (Tabla 3). No se hallaron diferencias significativas en el número de larvas vivas entre todas las proporciones, excepto entre 1:1 y 7:1 ($F=3,17$ df = 3, $p > 0,05$) (Tabla 3). Por otro lado ninguna larva resultó infectada en los controles. En el control con larvas expuestas solo al nematodo, la prevalencia del parasitismo fue más alta que la prevalencia de la infección con MIV en los ensayos, excepto por la proporción 7:1 (Fig. 5). La mortalidad de las larvas sanas no excedió el 5,5% ($n = 180$).

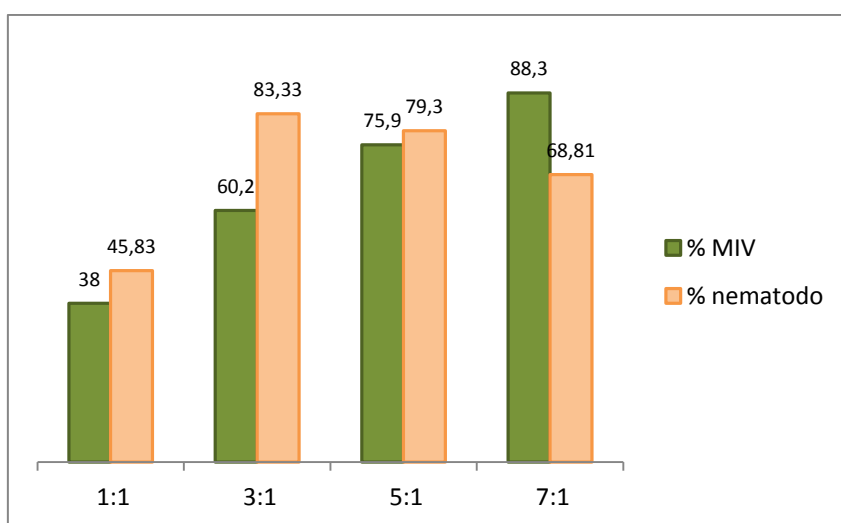


Figura 5. Comparación entre la prevalencia del iridovirus (% MIV) en *Culex pipiens* en los ensayos con diferentes proporciones de *Strelkovimermis spiculatus* (J2): larva de mosquito y la prevalencia del nematodo en los controles sin virus (% nematodo).

Tabla 3.

Variación de la infección con MIV en larvas de segundo estadio de *Culex pipiens* expuestas al virus y a una proporción creciente de pre-parásitas (J2).

J2:L2	Nº de larvas expuestas (Total)	Nº de larvas vivas (promedio entre réplicas) *	Nº de larvas infectadas (promedio entre réplicas)*
1:1	180	19,2±0,9 a	7,3±2 a
3:1	180	18,5±1,1 ab	11,2±3,2 b
5:1	180	18,3±1,4 ab	13,9±3,7 bc
7:1	180	17,1±2,1 b	15,1±2,2 c

*Promedio ±DS, los valores seguidos por una letra en común no son significativamente diferentes según Tukey'sHONASD test ($p=0,05$).

Estadio de la larva

Cuando las larvas de diferentes estadios fueron expuestas al virus y al nematodo, se encontró que todos los estadios fueron susceptibles a la infección. La prevalencia promedio de la infección con MIV varía entre 82,5 % (n=180) para el primer estadio larval y 5% (n=180) para el cuarto estadio larval (Fig. 6). Las diferencias en el número de larvas infectadas entre todos los estadios fueron altamente significativas ($F= 19,91$, $df=3$, $p<0,01$). Test a posteriori muestran diferencias significativas en el número de larvas infectadas entre todos los estadios excepto entre el primer y el segundo estadio (Tabla 4). No se encontraron diferencias significativas en el número de larvas vivas entre los estadios larvales ($F=2,13$, $df=3$, $p>0,05$) (Tabla 4). No se registró infección por MIV en ninguno de los controles y la mortalidad de las larvas sanas no excedió 13% (n=240).

Tabla 4.

Variación de la infección con MIV sobre diferentes estadios larvales de *Culex pipiens* expuestas al virus y al nematodo en proporción 5:1 (J2: larva de mosquito).

Estadio de la larva	Nº de larvas expuestas (Total)	Nº de larvas vivas (promedio entre réplicas)*	Nº de larvas infectadas (promedio entre réplicas)*
1ro	180	14,9±2,7 a	12,3±2,8 a
2do	180	17,0±1,9 a	11,2 ±4,4 a
3er	180	17,1±2,2 a	6,4±4,5 b
4to	180	17,7±2,6 a	0,9±1,3 c

*Promedio ±DS, valores seguidos por una letra en común no son significativamente diferentes según Tukey's HORASD test ($p=0,05$).

Cantidad de inóculo

Se expusieron larvas de *C. pipiens* a diferentes cantidades de inóculo (Larvas Infectadas=LI), asumiendo que cada larva infectada tiene alrededor de $5,85 \times 10^8$: ½ LI ($2,92 \times 10^8$ partículas virales), 1LI ($5,85 \times 10^8$ partículas virales), 3 LI ($1,75 \times 10^8$ partículas virales) y 6LI ($3,51 \times 10^9$ partículas virales). La prevalencia de la infección con MIV decrece desde el primer inóculo (86,1% (n=180)) al cuarto inóculo (43,3% (n=180)) (Fig. 6). Se encontraron diferencias altamente significativas en el número de larvas

infectadas para las diferentes cantidades de inóculo ($F=7$, $df=3$, $p<0,01$), específicamente entre los pares 1/2 IL–3 IL y 1/2 IL–6 IL (Tabla 5). La mortalidad de las larvas sanas no excedió el 5% ($n = 60$).

La prevalencia de la infección con MIV fue 48% en el ensayo con inóculo diluido ($n = 180$). La prevalencia del nematodo en el control fue 41.5% ($n = 40$). La mortalidad en el control fue 10,8% ($n = 40$) (Tabla 6).

Tabla 5

Variación de la infección con MIV en larvas de *Culex pipiens* expuestas a inóculo viral creciente y al nematodo en proporción 5:1 (J2: larva de mosquito).

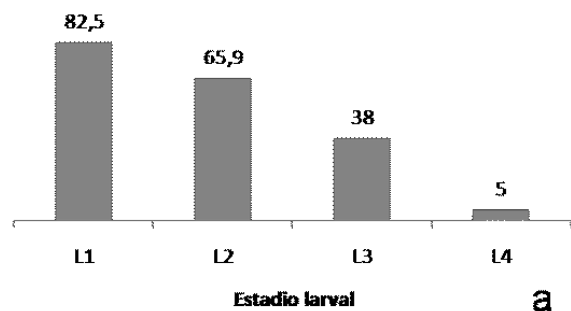
Inóculo	Nº de larvas expuestas (Total)	Nº de larvas vivas (promedio entre réplicas)*	Nº de larvas infectadas (promedio entre réplicas)*
½ Li	180	15,8 ± 3,5 a	13,5 ± 3,7 a
1Li	180	15,5 ± 2,4 a	11,5 ± 3,0 b
3 Li	180	15,3 ± 3,3 a	8,1 ± 3,3 c
6 Li	180	17,3 ± 2,9 a	7,5 ± 2,8 c

*Promedio ±DS, valores seguidos por una letra en común no son significativamente diferentes según Tukey's HORASD test ($p=0,05$).

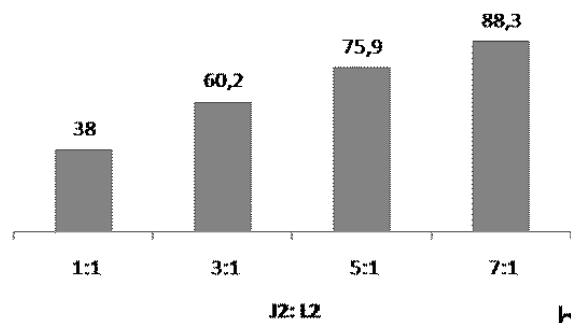
Tabla 6

Resultado de la infección con MIV en larvas de *Culex pipiens* expuestas a un inóculo 80 veces diluido y al nematodo en proporción 5:1 (J2: L2).

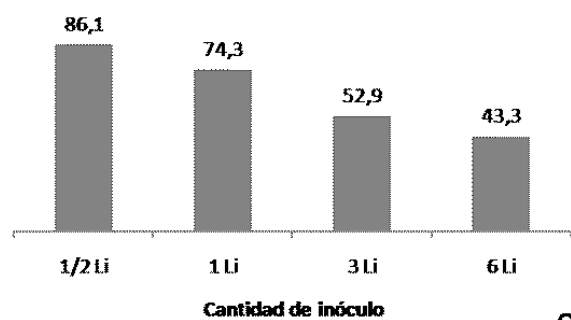
	Nº de larvas expuestas (total)	Nº de larvas vivas (promedio entre réplicas)±DS	Nº de larvas infectadas (promedio entre réplicas) ±DS
Volumen 80 veces mayor	180	17,4 ±3	8,3 ±3,8



a



b



c

Figura 6. Prevalencia (%) de la infección con MIV en larvas de *Culex pipiens* mediada por el nematodo *Strelkovimermis spiculatus*. Variación de la susceptibilidad al virus en los diferentes estadios larvales del mosquito(a), diferentes proporciones de *pre- parásitas* (J2): *larva de mosquito* (L2) (b), crecientes cantidades de inóculo en forma de larvas infectadas (Li).

Discusión

Se intentó transmitir el virus iridiscente de mosquito de forma horizontal utilizando diferentes mecanismos. En los ensayos donde se evaluó la transmisión por vía oral solo fue posible infectar dos larvas de segundo estadio con inóculos de tres y seis larvas infectadas. Si tenemos en cuenta todas las larvas expuestas solamente al virus, en ensayos y controles, la prevalencia de larvas infectadas por esta vía resulta casi nula (0,06% (2larvas infectadas/3500 larvas sanas)). Contrario a esto es lo que se ve en estudios de laboratorio relacionados, donde se evaluó la transmisión horizontal de un MIV en *Aedes taeniorhynchus*. En este caso, los autores lograron la infección simplemente colocando cadáveres infectados junto a larvas sanas (Linley y Nielsen, 1968a; Undeen y Fukuda, 1994). En los ensayos donde se tuvo en cuenta la entrada del virus por medio de laceraciones en la cutícula o el tubo digestivo (tierra de diatomeas, arena gruesa en agitación, densidad poblacional alta) los resultados fueron negativos. Por el contrario, fue posible obtener altos niveles de infección cuando se colocaron juveniles pre-parásitos de *Strelkovimermis spiculatus* junto al virus y larvas sanas de *Culex pipiens* en condiciones de laboratorio. Dado que este parásito rompe la cutícula de la larva de mosquito para introducirse en el hemocele de la misma y allí desarrollar parte de su ciclo vital, este podría ser el punto de entrada del virus a la larva o el mismo podría ser vehiculizado por el pre-parásito.

Todos los estadios larvales de *C. pipiens* fueron susceptibles a la transmisión del virus mediada por el mermítido, sin embargo hubo diferencias significativas en la prevalencia de la infección entre los estadios tempranos y tardíos, siendo más alta en los primeros. Este resultado se condice con el decaimiento en el parasitismo por *S. spiculatus* en larvas de mosquito de estadios tardíos observado por Achinelly y Camino (2005), por lo cual podemos suponer que la menor infección por MIV está directamente relacionada con la naturaleza del nematodo y no con una condición del virus en sí. Cuando se evaluó el efecto de diferentes proporciones J2: L2, la prevalencia de MIV se incrementó en 50 % desde 1:1 a 7:1. Resultados similares fueron obtenidos por Camino y García (1992) trabajando con factores que afectan el parasitismo por

este mermítido en larvas de mosquito. Un alto número de formas pre-parásitas incrementa la probabilidad de que las larvas se infecten con el virus si consideramos que la entrada del mismo a la larva de mosquito se relaciona con el ingreso del nematodo. Cuando se expusieron larvas de *Cx pipiens* a diferentes cantidades de inóculo viral en presencia del parásito se obtuvo un resultado inesperado: la prevalencia del virus decreció significativamente desde el menor inóculo al mayor, en vez de incrementarse, como muestran otros estudios en los que fue posible la transmisión del virus iridiscente prescindiendo del nematodo (Linley and Nielsen, 1968b). Buscando una explicación a este resultado se observó que algunas J2 se engancharon en los restos cuticulares de las larvas utilizadas como inóculo, lo que les impediría desplazarse en busca de un hospedador. Como estos restos aumentan al aumentar la cantidad de inóculo podría ser que cada vez más pre-parásitas quedarán enganchadas, resultando en menor número de larvas parasitadas y esto produciría la reducción en la prevalencia del virus. Por otro lado también se consideró la posibilidad de que las partículas virales afecten a las pre-parásitas de alguna manera que les dificulte o impida la entrada del parásito a la larva y de esa forma imposibilite en alguna medida la transmisión del virus. Esta temática se abordará en el capítulo 4.

En un intento de acercar los resultados de laboratorio a la realidad del campo se evaluó el efecto que tiene sobre la prevalencia del virus una concentración viral muy diluida con respecto a los anteriores ensayos (80 veces), sumado a baja densidad de pre-parásitas y larvas de mosquito. El porcentaje de infección se redujo de 75,9% (1 Li en 25 ml) a 42% (1 Li en 2000 ml) usando la misma proporción J2:L2 (5:1) que en ensayos anteriores. Se observó una diferencia menor a la esperada teniendo en cuenta que se realizó una dilución importante. Esto demuestra que aún en grandes volúmenes de agua (zanjas de drenaje domiciliario) el encuentro entre las pre-parásitas, las partículas virales y las larvas de mosquitos, para producir la infección viral, es altamente probable.

Por otro lado, en las disecciones de larvas de campo de *C. pipiens* infectadas con MIV (Capítulo 2) fue posible comprobar la presencia del nematodo en menos del 50 % de las larvas, esto podría indicar que existe otra vía de entrada del virus al hospedador. Otro motivo por el cual no se halla el pre-parásito dentro de larvas de mosquito

infectadas podría estar relacionado con la respuesta inmune del hospedador, dado que algunas especies de mosquito muestran habilidad para bloquear el normal desarrollo de los nematodos parásitos (Poinar et al., 1979). Toda la información presentada en este capítulo, muestra la necesidad de profundizar los estudios en relación al ciclo de vida natural de estos virus con el objetivo de dilucidar el rango total de vías involucradas en la transmisión del virus iridiscente de mosquitos. En este sentido, en el próximo capítulo será abordada la interacción nematodo-virus- mosquito.

Capítulo 4

Interacción Nematodo- Iridovirus- Mosquito

Introducción

En este trabajo de tesis se ha demostrado la coexistencia de dos patologías en poblaciones naturales de larvas de *Culex pipiens*, la infección debida a un iridovirus patógeno de mosquitos y el parasitismo debido a *Strelkovimermis spiculatus*, un nematodo mermítido. Estudios de campo y laboratorio sugieren una fuerte asociación entre ambos patógenos (Capítulos 1 y 3). La transmisión horizontal del virus en larvas de *C. pipiens* en laboratorio solo fue exitosa en presencia del nematodo, esto podría estar indicando que el parásito facilita la entrada del virus a la larva de alguna manera no conocida hasta el presente, o que tiene una relación directa actuando como vector del mismo. Una situación similar fue estudiada por Mullens et al. (1999) en un sistema constituido por el ceratopogónido *Culicoides variipennis sonorensis* parasitado por el mermítido *Heleidomermis magnapapula* e infectado por un iridovirus. Los autores comprobaron que en ausencia del nematodo la infección por virus fue menor a 1%. En ese trabajo se postuló que el virus podría ingresar al hospedador juvenil con el parásito, pero no comprobaron la forma en que esto ocurre, incluso no consideraron la posibilidad de que el nematodo adquiriera el virus y luego lo transmita al hospedador. Otro caso de coexistencia de un nematodo (*Corethrellonema grandispiculosus* Nickle) y un iridovirus infectando un díptero (*Corethrella brakeleyi*) fue mencionado por Chapman et al. (1971). De forma similar pero en un sistema terrestre, ejemplares de los isópodos *Porcellio scaber* Latrille y *Armadillidium vulgare* (Latreille) se hallaron infectados con virus iridiscente y al mismo tiempo parasitados por mermítidos de la especie *Thaumamermis cosgrovei* Poinar, la cual fue descrita posteriormente a este hallazgo. La particularidad de este caso es que algunos de los nematodos extraídos de isópodos infectados también lo estaban. Se comprobó que el virus proveniente de los nematodos era infectivo para los isópodos cuando se les inyectaron purificados del mismo. Durante el desarrollo del anterior estudio también se recolectaron del suelo nematodos pos-parásitos portadores de la enfermedad. Esta fue la primera y única vez que se descubrió un nematodo infectado con iridovirus (Poinar et al. 1980; Williams, 2008).

Un aspecto interesante de la interacción *C. pipiens*-MIV- *S. spiculatus* radica en el posible efecto del virus sobre el nematodo que se encuentra en el hemocoele de la larva infectada por MIV. Observaciones de campo y laboratorio nos llevaron a postular la hipótesis de que el nematodo se infecta y muere a causa del virus. En este capítulo se explora el estudio del posible rol del parásito en la vía de transmisión del iridovirus y el destino del mismo en la larva de mosquito infectada.

Materiales y Métodos

Susceptibilidad de *Strelkovimermis spiculatus* al iridovirus

Con el fin de comprobar la susceptibilidad de *S. spiculatus*, y de entender el proceso por el cual este organismo actuaría en la transmisión del virus, ejemplares en distintas etapas de su ciclo vital fueron expuestos al iridovirus y luego examinados con microscopia electrónica de transmisión. El procesamiento de las muestras y posterior visualización fue realizado en el Servicio de Microscopia Electrónica de la Facultad de Veterinaria, UNLP.

Etapas pre- parásita

En un posible escenario, el segundo juvenil (J2) o forma pre-parásita de *S. spiculatus* (ver ciclo del parásito en Apéndice 2: Cría y mantenimiento de *Strelkovimermis spiculatus* en laboratorio) podría adquirir el virus en el agua del sitio de cría de las larvas de mosquitos, previamente a introducirse en su huésped, ya sea infectándose o transportando las partículas virales de forma mecánica.

100 J2 recién emergidos de las cajas de cría (Ver Apéndice 2) fueron expuestos a la suspensión viral (larvas de mosquito infectadas y homogenizadas) por 24 horas, que es el tiempo promedio que demora el parásito en ingresar a la larva (Camino y Reboledo, 1994), o sea, el tiempo que tendría disponible el juvenil para adquirir el virus antes de ingresar. Luego de cumplido este tiempo fueron procesados para ser observados con microscopio electrónico. Los J2 fueron concentrados mediante centrifugación a 1500 rpm, fijados en glutaraldehído 2% por 2 horas a 4 °C y lavados con buffer fosfato. Posteriormente fueron embebidos en agar. El bloque de agar fue fraccionado en pequeñas piezas que se posfijaron en tetróxido de osmio 1% por 2 horas a 4 °C y se deshidrataron usando concentraciones crecientes de etanol en acetona. Las piezas así fijadas fueron embebidas en resina Epon-Araldita. Las secciones ultra finas (60 nm) fueron teñidas con acetato de uranilo 2% y citrato de plomo y se examinaron con un microscopio electrónico de transmisión (JEOL modelo JEM 1200 EXII).

Etapas parásita

En otro escenario podría ser que la larva de mosquito transmita el virus al parásito, infectándose el mismo al cumplir parte de su ciclo dentro de una larva infectada.

Dos ejemplares de *S. spiculatus* (J3 o J4) fueron extraídos del hemocoele de larvas de *C. pipiens* de cuarto estadio infectadas con MIV en el laboratorio. Los nematodos presentaban una coloración violácea en lugar de la característica coloración blanquecina. Dado que esta coloración diferente podría ser debida a una infección viral la muestra fue procesada para su posterior observación mediante microscopía electrónica de transmisión.

Etapas pos-parásita

Pos-parásitos de *S. spiculatus* luego de concluir su fase parásita en larvas de mosquito libres de virus, fueron colocados en una capsula de Petri sobre arena gruesa inmersa en agua (Ver Apéndice 2). Se agregó al agua siete larvas de mosquito infectadas con el virus y homogenizadas. Se seleccionó una cantidad de inóculo suficiente para asegurar la distribución de partículas virales en toda la superficie de la capsula. Durante 24 hs los nematodos se enterraron naturalmente. Luego se extrajo el agua de la capsula y se guardó en un lugar oscuro. Cuarenta y ocho horas después, los nematodos fueron desenterrados y evaluados en busca de síntomas de infección viral, tras lo cual, fueron enterrados y almacenados nuevamente. El procedimiento fue repetido una semana después de la inoculación. Un mes después, la caja fue inundada para producir el nacimiento de las formas pre-parásitas con lo cual se obtuvieron 10 J2. Se desenterraron nuevamente los nematodos adultos para ser revisados en busca de signos de infección. Se realizó un ensayo colocando los 10 J2 con 10 larvas de *C. pipiens* de segundo estadio en un recipiente con 150 ml de agua, no se agregó inóculo viral. Se evaluaron las larvas de mosquito en busca de infección por MIV a las 72 hs.

Múltiple parasitismo e infección con MIV

En muestras de campo, aunque en pocas oportunidades, se hallaron larvas de mosquito infectadas con MIV y al mismo tiempo, parasitadas con *S. spiculatus* en su forma juvenil tardía. Por el contrario, en ensayos de transmisión en laboratorio, no se

observó el desarrollo normal del nematodo y la emergencia del mismo. En busca de una explicación, se realizó un ensayo cuya finalidad fue comprobar si en una situación donde se da el parasitismo en dos tiempos diferentes, un nematodo que ingresó con anterioridad al virus puede seguir desarrollándose con normalidad. El mismo constó de dos etapas, una primera infección para producir la parasitosis y una segunda infección en donde estas larvas parasitadas se exponen a un segundo ciclo de parasitosis al que se le adiciona en este caso el virus. El ensayo se detalla a continuación. Durante una primera etapa, se expusieron larvas de *C. pipiens* de segundo estadio al nematodo en proporción 5:1 en un recipiente con 300 ml de agua declorinada hasta que las larvas de mosquito alcanzaron el tercer estadio tardío o cuarto estadio temprano. En la segunda etapa del ensayo se tomaron 30 de estas larvas (suponiendo que la mayoría estarían parasitadas) y se aislaron en un contenedor plástico de 30 ml con 25 ml de agua destilada, se volvieron a exponer a pre-parásitas (5:1) y fue adicionada una larva infectada como inóculo viral. Al día siguiente, las larvas fueron transferidas a un recipiente plástico con 150 ml de agua destilada y alimento para cobayo finamente molido para permitir el desarrollo. A las 72 hs luego de la exposición al virus, las larvas con síntomas de infección con MIV fueron separadas y observadas bajo microscopio óptico para detectar la presencia de nematodos en el hemocele.

Resultados

Susceptibilidad de *Strelkovimermis spiculatus* al iridovirus

Etapa pre- parásita

Los cortes ultra finos de juveniles pre-parásitos expuestos al virus fueron estudiados con microscopia electrónica. En ningún caso se observó la presencia de partículas virales dentro de los mismos. Por otro lado, se observaron numerosas partículas virales rodeando al parásito y muchas de ellas parecen estar adheridas de alguna manera a la cutícula del mismo (Figs. 1, 2a y 2b). En otros cortes no se aprecian partículas por fuera del individuo (Fig.2c). Teniendo en cuenta el estudio realizado podemos decir que en las condiciones del ensayo, los juveniles pre-parásitos no serían susceptibles a la infección viral.

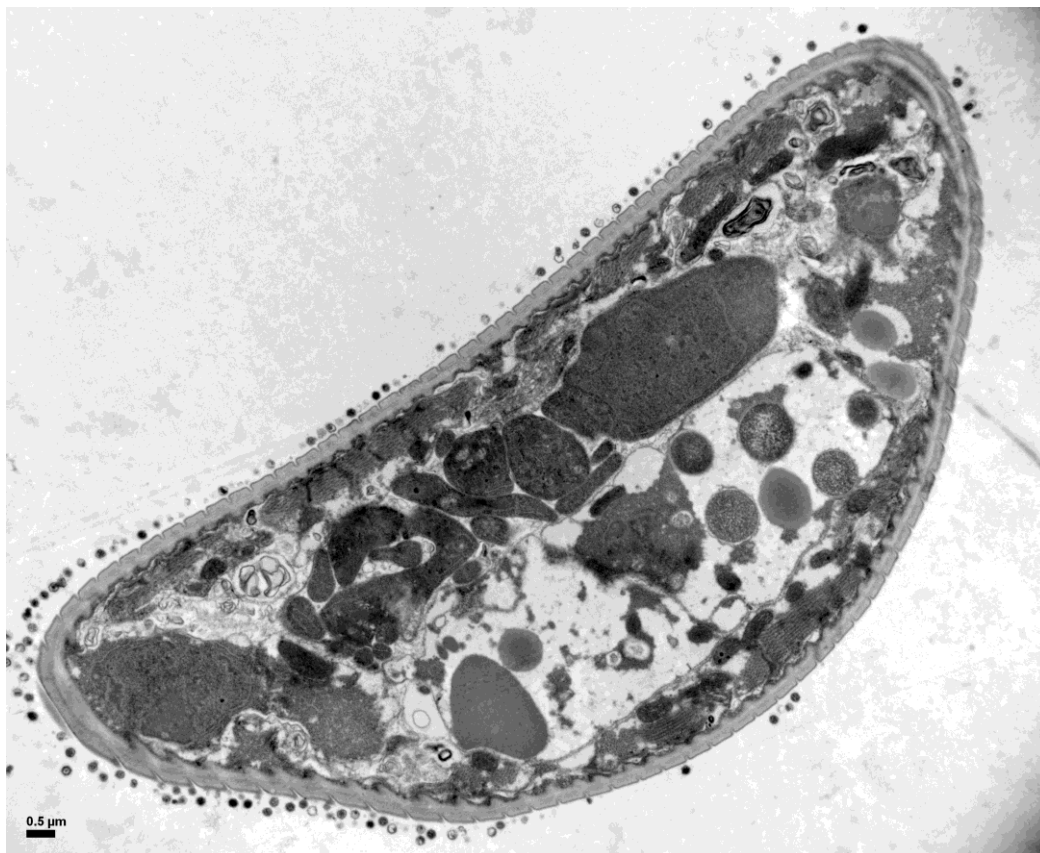


Figura 1. Ultraestructura de un juvenil pre-parásito de *Strelkovimermis spiculatus* previamente expuesto al iridovirus por 24 hs. Se observan partículas virales muy cercanas a la cutícula

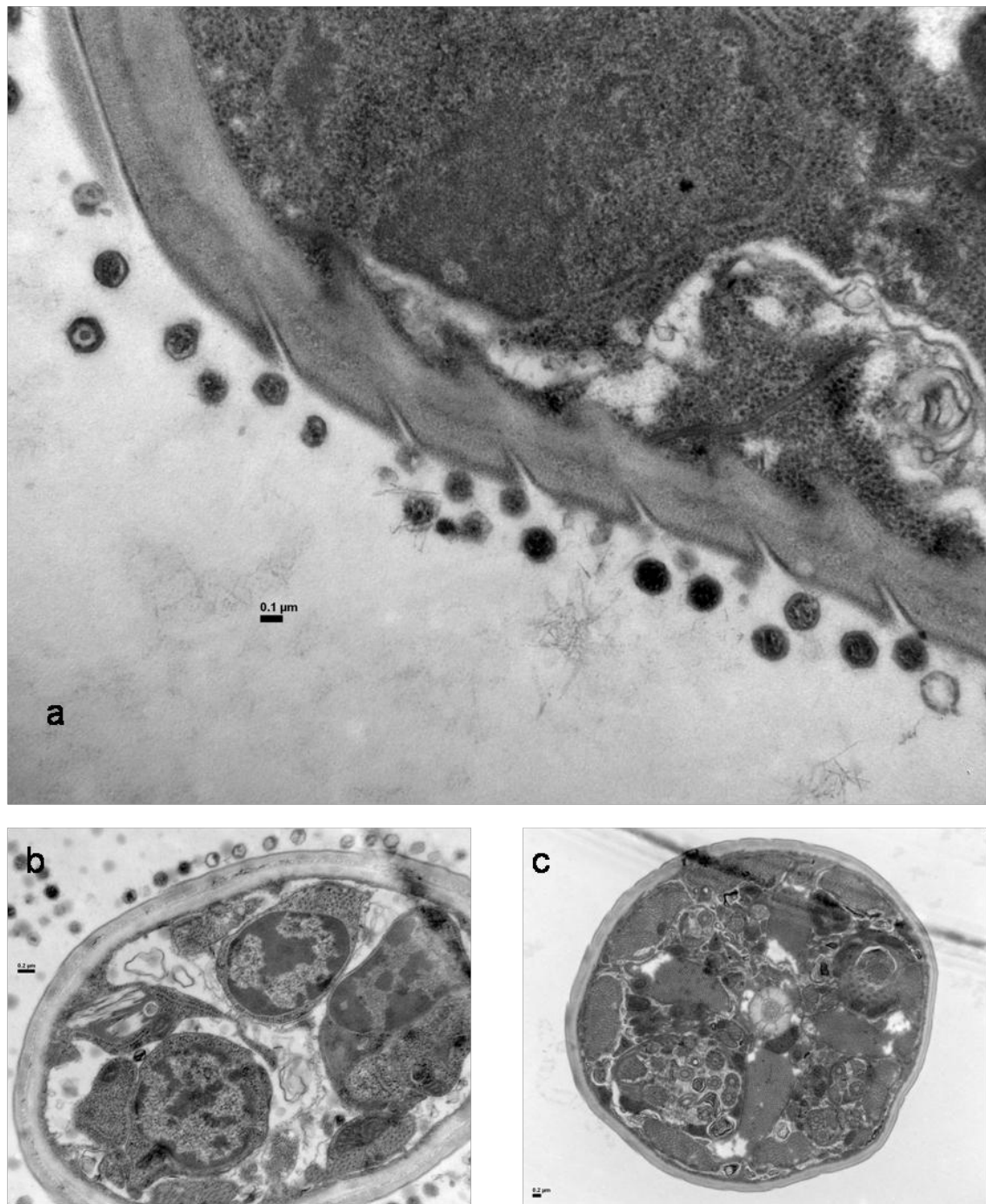


Figura 2. Cortes ultrafinos de juveniles pre-parásitos de *Strelkovimermis spiculatus* previamente expuestos al iridovirus por 24 hs. Detalle de la ultraestructura del tegumento de un parásito con partículas virales muy cercanas a la cutícula (a y b). Corte transversal donde no se observan partículas virales tanto en el interior como en el exterior del individuo (c).

Etapa parásita

En los cortes ultrafinos realizados a partir de parásitos juveniles tardíos extraídos de larvas de *C. pipiens* infectadas con iridovirus no se observaron partículas virales en el interior ni en la superficie externa del cuerpo de los mismos (Fig. 3).

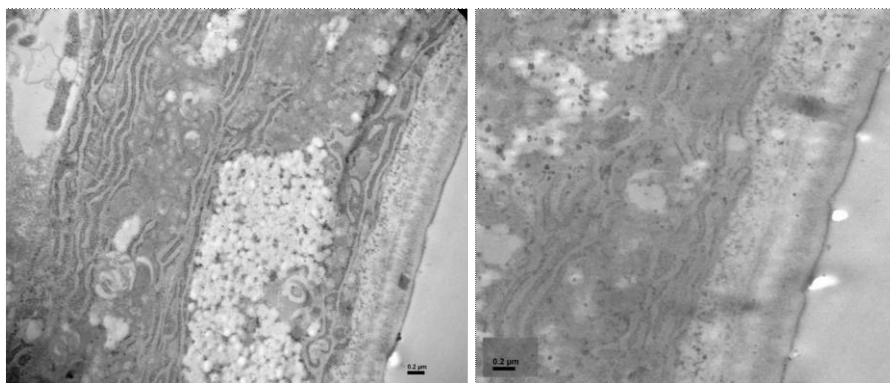


Figura 3. Cortes ultrafinos de juveniles tardíos de *Strelkovimermis spiculatus* extraídos de larvas de *C. pipiens* infectadas con iridovirus. No se aprecian partículas virales dentro ni fuera del cuerpo del parásito.

Etapa pos-parásita

Los nematodos adultos desenterrados a los 2 días, 7 días y un mes después de enterrarse en presencia del virus no presentaron síntomas de la patología. En los cortes ultrafinos no se observaron partículas virales dentro ni fuera del cuerpo del parásito (Fig.4). La infección realizada con las J2 emergidas de esta colonia dio como resultado una prevalencia del virus del 30 %.

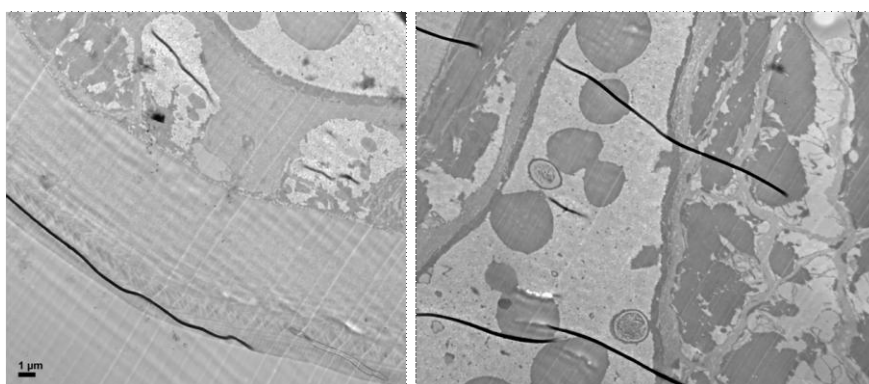


Figura 4. Cortes ultrafinos de nematodos adultos expuestos al virus durante un mes. No se observan partículas virales.

Múltiple parasitismo e infección con MIV

Larvas de mosquito de tercer estadio previamente parasitadas y posteriormente expuestas al virus y J2 fueron evaluadas en busca de infección viral. Se detectaron 10 larvas (n=30) infectadas con MIV, de las cuales en cinco se pudo comprobar la presencia del nematodo con microscopía óptica sin producir la muerte del ejemplar, en tres casos como juveniles tardíos. En días subsecuentes todas las larvas infectadas murieron entre el 5^{to} y el 9^{no} día y solo un juvenil pos-parásito emergió antes de la muerte del hospedador.

Discusión

Para comprobar la susceptibilidad del nematodo al MIV en distintos momentos de su ciclo vital y tratar de entender cómo se produce la transmisión del virus mediada por el mismo, se realizaron estudios ultraestructurales. Observaciones de las formas pre-parásitas expuestas al MIV muestran acarreo de partículas virales sobre la cutícula. Al parecer, las mismas presentarían algún tipo de adhesión que justifique la presencia de una capa de partículas equidistantes a la cutícula, a pesar del largo proceso de preparación de la muestra para microscopía electrónica. Por otro lado, no fue posible detectar focos de infección dentro de los nematodos en ninguna etapa del ciclo evaluada. Este resultado estaría indicando que, probablemente, los nematodos no sean susceptibles al virus. Por otro lado, dada la dificultad que presenta la búsqueda de partículas pequeñas a nivel ultraestructural no es posible descartar la presencia del virus en otras partes del cuerpo del individuo. Por otro lado, la prueba de infección realizada con los J2 provenientes de los nematodos adultos expuestos al virus y larvas de mosquito, sin agregado de inóculo viral, dio como resultado una prevalencia del virus de 30%. Esto podría significar que efectivamente las J2 se infectan y transmiten la enfermedad, o que las partículas virales sobrevivieron un mes en la arena húmeda de la caja de cría donde se mantenían dichos parásitos adultos expuestos al virus, bajo las condiciones de conservación de la colonia de nematodos (temperatura media, humedad y oscuridad); temática que se abordará en el Capítulo 6.

Algunas larvas de *Culex pipiens* recolectadas en el campo que se encontraban infectadas con virus iridiscente estaban parasitadas con juveniles tardíos de *Strelkovimermis spiculatus* que en algunos casos lograron emerger (Muttis et al., 2013). Por el contrario, en ensayos de laboratorio, se vio que en larvas de mosquito infectadas con el virus, el nematodo no fue capaz de desarrollarse hasta estadios tardíos y emerger con normalidad, sugiriendo cierto efecto negativo del virus sobre la supervivencia del parásito. El ensayo realizado demuestra que el hallazgo de pos-parásitos emergiendo de larvas infectadas podría corresponder a una situación de múltiple parasitismo que se da en la naturaleza (Campos y Sy, 2003), donde una larva de mosquito se ve parasitada por nematodos en distintos momentos de su desarrollo.

Tal como sucede en el ensayo, un pre-parásito entra a su hospedador en un primer momento, y luego de un tiempo, otra pre-parásita ingresa al mismo hospedador llevando partículas virales y produciendo la infección viral de la larva. Al parecer, el primer parásito que ingresa sin el virus es el que llegaría, en algunos casos, a estar en condiciones de emerger. Los datos sugieren que los nematodos que ingresan con el virus se ven afectados de alguna manera, muriendo o al menos deteniendo su crecimiento. También parecen verse afectados los nematodos que se encuentran casi al término de su desarrollo ya que solo 2 de 7 juveniles tardíos a los cuales se les realizó un seguimiento, logró emerger.

Está comprobado que el nematodo favorece directamente el ingreso del virus a la larva de mosquito. El pre-parásito, al perforar la cutícula del hospedador en su camino al hemocele, genera una vía de ingreso al virus. La relación *parasitismo-infección viral* resulta ser directa por lo que se descarta una entrada del virus casual a través del orificio dejado por el mermítido a su paso. La presencia de partículas virales que parecieran estar adheridas a la superficie del pre-parásito y que llevaría consigo hacia el interior del insecto, es una posible explicación de la vía de transmisión del virus en este sistema, ya que estaría actuando como vector mecánico. La otra posible hipótesis de ingreso al hospedador, por medio de J2s infectados con el virus, no fue comprobada.

Capítulo 5

Patología producida por el iridovirus en
larvas de *Culex pipiens*

Introducción

El conocimiento de la patología producida por la familia Iridoviridae (particularmente los géneros que afectan a Invertebrados: *Chloriridovirus* e *Iridovirus*) en sus primeros momentos, se limitaba al síntoma más evidente que le da origen a su nombre, la iridiscencia. Los hospedadores afectados presentan un cambio en la coloración producto de un efecto óptico debido a la acumulación de partículas virales en los tejidos, con la consiguiente formación de un arreglo paracristalino apreciable sobre un escenario oscuro. Este fenómeno conocido como difracción Bragg, se da cuando la luz reflejada en una superficie con partículas virales densamente empaquetadas interfiere con la luz incidente (Chinchar, 2009). Muchos años más tarde, mediante un trabajo realizado en simúlidos se presentó evidencia de que la patología de esta familia viral es más compleja de lo supuesto, exponiendo que hay dos formas de infección por iridovirus, una evidente y mortal, otra encubierta y subletal. Mientras las infecciones evidentes suelen ser raras, parece ser que un alto porcentaje de la población hospeda al virus de forma que no presenta mortalidad ni síntomas claros de la enfermedad. Esto fue comprobado usando dos técnicas, por inyección de homogenatos de larvas de simúlidos carentes de síntomas en larvas de una especie de lepidóptero permisiva para el virus y por otro lado, fue confirmada la presencia de ADN viral en los tejidos del hospedador mediante PCR (Williams, 1993). Esta situación en simúlidos fue posteriormente comprobada en Culícidos en un estudio donde se evaluaron los efectos subletales del virus IIV-6 en larvas de *Aedes aegypti*. Los efectos observados fueron: tiempos de desarrollo extendido, pesos de pupas reducidos, adultos de menor tamaño y menor fecundidad (Marina et al., 1999). Por razones aún desconocidas, la proliferación masiva de las partículas virales observadas en infecciones evidentes no ocurre en los hospedadores infectados de manera encubierta. No se conoce el mecanismo por el cual el virus en estas infecciones encubiertas produce enfermedad subletal en lugar de la evidente.

Estudios realizados en distintas especies de mosquitos describen que la infección se hace evidente en el tórax de larvas de tercer estadio tardío o cuarto temprano pasando luego

al abdomen. Se reportó iridiscencia en una variedad de colores: amarillo, naranja, verde, violeta o turquesa (Chapman et al, 1966; Clark, 1965; Anderson, 1970). Estas variaciones podrían deberse a una diferencia en el tamaño de la partícula viral, presentando coloración violeta, azul o turquesa las partículas de tamaños entre 110-130 nm de diámetro mientras que verde, amarillo o naranja en el rango de 160-200 nm (Williams, 2008). La infección fue progresiva, con un importante aumento de la intensidad de la iridiscencia; las larvas mas infectadas murieron en cuarto estadio, sin importar el momento en que comenzó la infección (Clark, 1965; Linley y Nielsen, 1968 a; Anderson, 1969). Individuos capaces de superar la pupación mostraron frecuentemente marcadas deformaciones de la pupa, especialmente en el esbozo alar, y murieron antes de emerger (Chapman, 1966; Matta y Lowe, 1970). Por otro lado, otros estudios realizados en *Aedes taeniorynchus* revelaron que larvas infectadas tardíamente en su desarrollo y que no mostraron síntomas evidentes de la enfermedad fueron capaces de desarrollarse hasta el estado adulto. Estos adultos infectados serían los responsables de la transmisión vertical del virus (Woodard y Chapman, 1968; Linley y Nielsen, 1968).

Los cambios patológicos a nivel celular incluyen redondeamiento, contracción y desprendimiento celular, formación de numerosas vesículas procedentes de las membranas, cambios en la posición y morfología de las mitocondrias y la aparición de estroma virogénico en el citoplasma, definido como extensas áreas de granulado desprovisto de organelas que son el sitio de montaje de las partículas virales (Williams, 2008).

Durante etapas tardías de la enfermedad, casi todos los tejidos del hospedador infectado con iridovirus presentan partículas virales. El cuerpo graso es prácticamente el sitio de replicación primario para todos los tipos de IVs. Este tejido es un sitio de reserva de sustancias muy importantes para el desarrollo de la metamorfosis, una infección viral intensiva en este tejido impide los procesos metabólicos evitando que las mismas completen el desarrollo (Adams y Bonami, 1991). La epidermis y los derivados epiteliales, como ser los discos imaginales y el epitelio traqueal, son sitios comunes de replicación. La infección en los nervios viscerales y ganglios fue escasamente documentada y las células no demostraron efectos citopáticos, lo cual puede explicar la capacidad de las larvas infectadas de nadar normalmente hasta corto tiempo antes de la muerte.

La patología a nivel histológico en estados inmaduros de mosquito fue estudiada por diversos autores. En uno de los primeros estudios realizados en larvas de *A. taeniorhynchus* infectadas con IV se encontró virus replicando solo en dos tejidos, el cuerpo graso y los discos imaginales y en un caso en tejido muscular de una pupa infectada (derivado de un disco imaginal). No se encontró evidencia de replicación en células epidérmicas, tejido nervioso, epitelio del intestino o túbulos de Malpighi (Matta y Lowe, 1970). Hall y Anthony en 1971 mediante un estudio similar al anterior pudo comprobar un rango de tejidos mayor que el reportado por Matta y Lowe, posiblemente debido a un uso más extendido de microscopia electrónica. El cuerpo graso fue el tejido más extensivamente infectado, la epidermis y tejidos derivados como el epitelio traqueal y los discos imaginales, pero también encontró evidencia de proliferación viral en esófago, nervios y músculo, así también como en tejidos gonadales. En otro estudio contemporáneo, se reportó en *Aedes stimulans* Walker partículas virales aisladas en la misma especie, en epidermis, músculo, cuerpo graso, discos imaginales, células pericárdicas, ovarios y testículos (Anderson, 1970).

En el presente capítulo se describe la patología producida por un iridovirus en su huésped natural *C. pipiens*. Tanto de la progresión de la enfermedad como de los tejidos afectados.

Materiales y Métodos

Patología general

Observaciones de campo

Las larvas infectadas recolectadas en algunos de los muestreos fueron sometidas a un seguimiento para evaluar la mortalidad. Se observó el color de la iridiscencia y los tejidos afectados. Se realizaron disecciones ocasionales.

Observaciones en Laboratorio

Con el objetivo de estimar un tiempo mínimo de inicio de la sintomatología y de obtener un tiempo de letalidad medio se realizaron tres replicas utilizando 100 larvas de *Culex pipiens* de segundo estadio. Para ello, las mismas fueron expuestas a pre-parásitas en proporción 2:1 (J2: larva mosquito) y a inóculo viral (dos larvas de cuarto estadio infectadas y homogenizadas) en 300 ml de agua declorinada. Se aumento la cantidad de inóculo con respecto a ensayos anteriores debido a que se utilizó para el mismo una mayor cantidad de larvas y para ello un volumen mayor de agua. El ensayo se mantuvo en condiciones de insectario a 25 °C y luego de 24 hs se transvaso a bandejas con 2 litros de agua declorinada. La evaluación de la infección comenzó a las 48 hs post-exposición y se tomó registro del número de larvas infectadas y el número de larvas muertas diariamente hasta los 10 días de comenzado el ensayo.

Cito e histopatología

Microscopia electrónica de larvas infectadas

Con el objetivo de estudiar la progresión de la sintomatología producida por el virus se realizó un ensayo donde se expusieron en 300 ml de agua declorinada, 100 larvas de *C. pipiens* de segundo estadio a 500 pre-parásitas (5:1) y dos larvas de *C. pipiens* infectadas con IV y homogenizadas. Transcurridas 5, 12, 24, 48 y 72 horas de iniciado el ensayo se tomaron 5 individuos y se fijaron en glutaraldehído 2.5 %. Las larvas fijadas fueron procesadas para microscopía electrónica como se describe en el Capítulo 2, en el Servicio de Microscopía Electrónica de la FCV-UNLP.

Resultados

Patología general

Progresión de la infección evidente

Si bien, en líneas generales, la infección viral tiene un patrón similar, la progresión de la misma puede ser muy variable entre un individuo y otro. Según las observaciones, la infección se hace evidente inicialmente en el tórax, siendo el tejido graso el primero en verse afectado. La infección sigue progresando posteriormente hacia el abdomen, mientras que la coloración iridiscente se intensifica gradualmente (Fig. 1). En etapas terminales de la enfermedad es común la infección general de la epidermis, haciéndose visible incluso en la cabeza, antenas, papilas anales y sifón (Fig. 2). Órganos internos en los que se comprobó infección viral son el esófago y las glándulas salivales. No se observó en tubo digestivo medio o posterior ni en túbulos de Malpighi y es dudosa en los ciegos gástricos (Fig. 3).

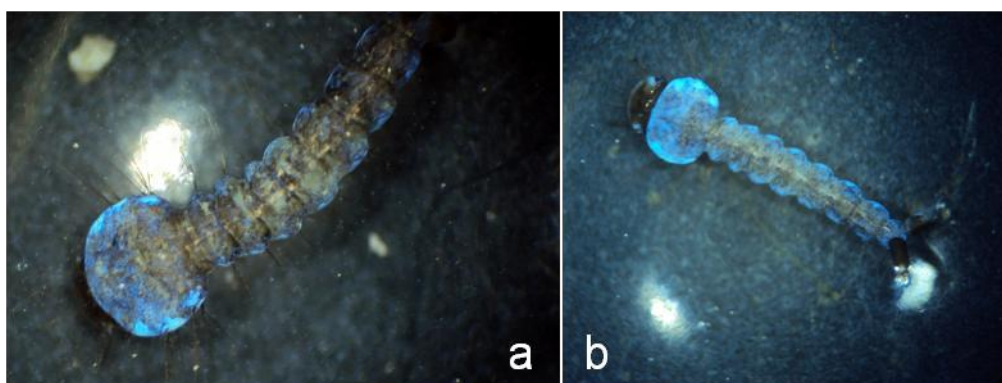


Figura 1. Progresión de la infección por iridovirus en larvas de *Culex pipiens*. Se observa una larva infectada intensamente en el tórax y mas levemente en el abdomen (a). Larva con la infección extendida en todo el cuerpo (b).

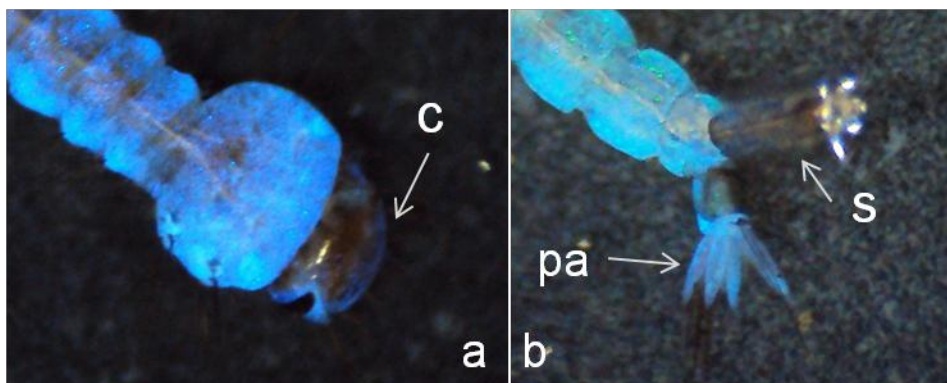


Figura 2. Larvas de *Culex pipiens* con infección viral avanzada en cabeza (c) (2.a) y en la parte posterior del abdomen, intensamente en papilas anales (pa) y levemente en el sifón (s) (2.b).

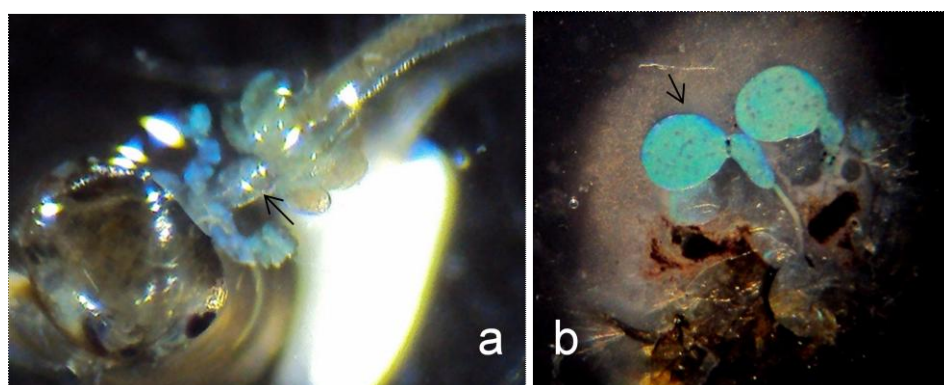


Figura 3. Órganos internos infectados con iridovirus en una larva de *Culex pipiens*. En esófago (a) y glándulas salivales (b).

Microscopía electrónica de larvas infectadas

En las larvas de 2, 5, 12 y 24 hs de infección no fue posible detectar la presencia de partículas virales (Fig. 4 y 5). Esto podría deberse a que las larvas a partir de las cuales se realizaron los cortes no se hallaban infectada por el iridovirus, aun cuando se evidenció la presencia de la pre-parásita en su interior. Por otro lado, la replicación viral, aun incipiente, pudo haber comenzado en un sitio alejado al observado al MET. En los cortes correspondientes a la larva de 48 hs de infección, se observan numerosas partículas virales en el tórax, mientras que solo se hallan escasas partículas virales en el abdomen, específicamente en el epitelio traqueal (Fig. 10); en otros tejidos no se evidenció infección por virus (Fig. 6). En los cortes de las larvas correspondientes a las 72 hs, tanto en el tórax como en el abdomen se observa gran cantidad de partículas virales ocupando todo el campo observado (Fig. 7).

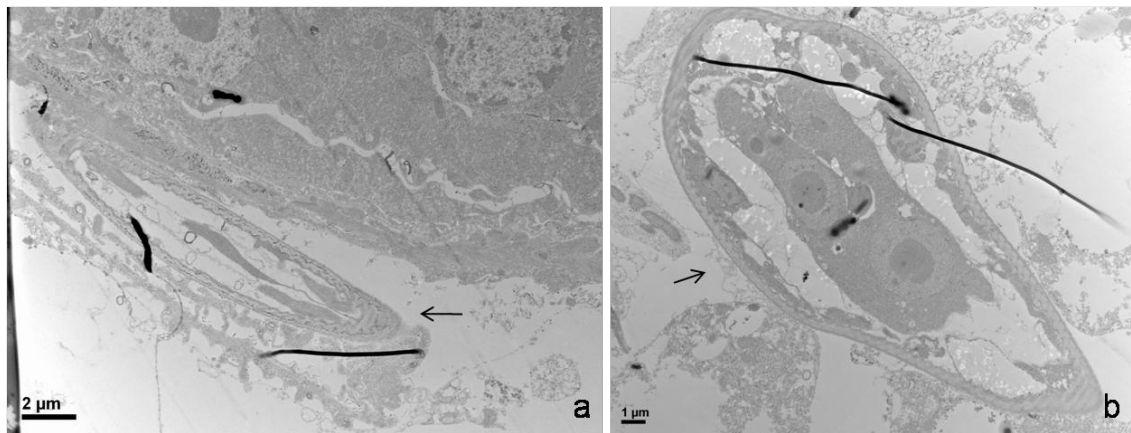


Figura 4. Cortes ultrafinos (MET) a nivel del tórax de una larva de *Culex pipiens* parasitada con *Strelkovimermis spiculatus* después de dos horas de comenzada la infección viral. Se observan tejidos del mosquito y del nematodo pero no se evidencian partículas virales. Tejido de la larva y el parásito ubicado en el hemocoele (a). Corte del parásito y tejido larval circundante (b).

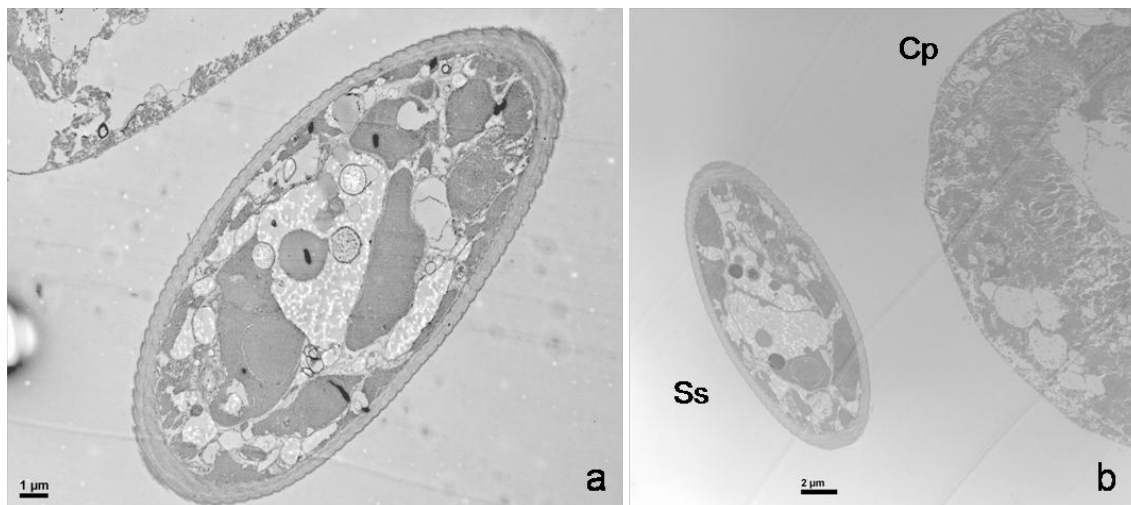


Figura 5. Cortes ultrafinos a nivel del abdomen de una larva de *Culex pipiens* parasitada con *Strelkovimermis spiculatus* después de cinco horas de comenzada la infección viral. Se observan tejidos del mosquito y del nematodo pero no se evidencian partículas. (a) Se observa parte del tejido de la larva y un corte casi transversal del parásito. (b) Corte de *S. spiculatus* (Ss) y tejido larval circundante (Cp).

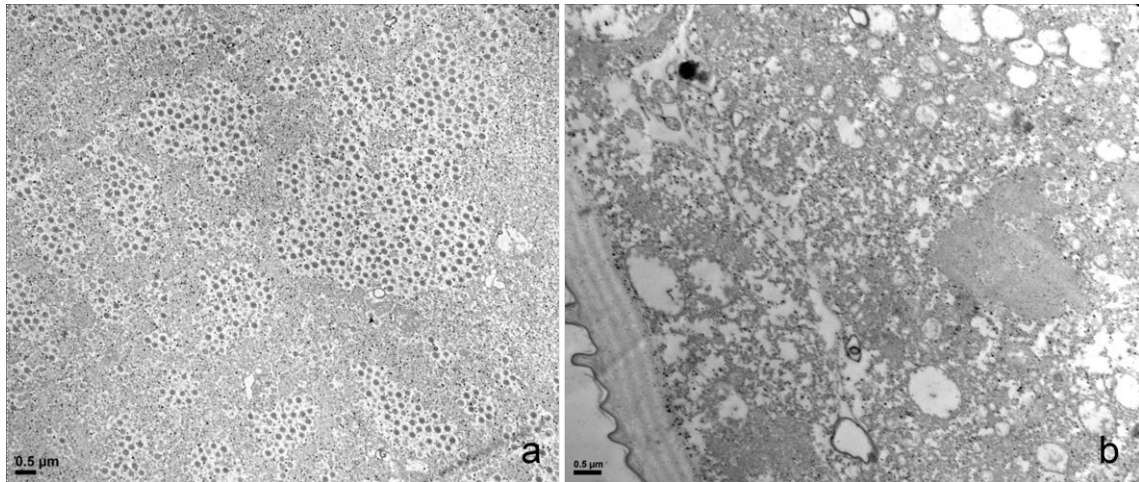


Figura 6. Corte ultrafino de una larva de *Culex pipiens* con 48 hs de infección. Se observa gran cantidad de partículas a nivel del tórax (a), mientras que a nivel del abdomen (b) no se evidencia presencia de las mismas.

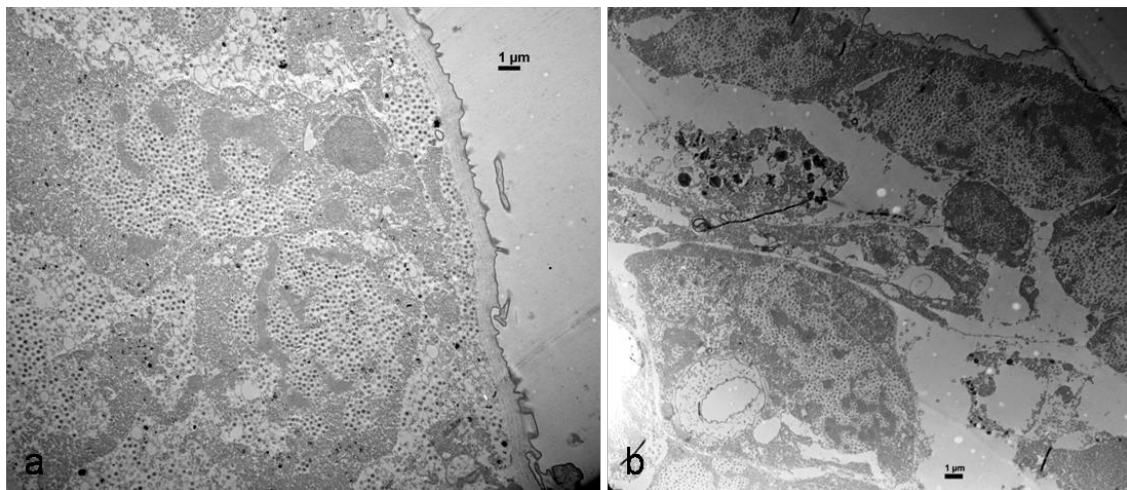


Figura 7. Cortes ultrafinos de una larva de *Culex pipiens* de 72 hs de infección. Tanto en el tórax (a) como en el abdomen (b) se observa gran cantidad de partículas virales.

Observaciones de campo

En muestreos a campo fue posible recolectar larvas infectadas de todos los estadios. Se determinó que las larvas halladas en segundo estadio tardaron entre 2 y 6 días en morir (Promedio= 4.33 ± 1.8 , $n=12$), en tercer estadio entre 2 y 7 días (5.25 ± 2.2 , $n=4$) y en cuarto estadio entre 1 y 9 días (5.23 ± 3.2 , $n=17$). También se realizó el seguimiento de 13 larvas de las cuales no hay registro del estadio en que fueron halladas. Se detectó una pupa infectada que murió 3 días después. Larvas infectadas en primer estadio

fueron registradas ocasionalmente pero no se realizó el seguimiento de las mismas. Si tenemos en cuenta un $n=46$ de larvas de mosquitos sin considerar el estadio en que fue hallada, se puede estimar que una larva infectada sobreviviría en promedio 4.71 ± 2.8 días normalmente en el mismo estadio o uno posterior. En ningún caso se observó una larva o pupa infectada de forma evidente, completar el desarrollo y emerger como adulto.

El color de la iridiscencia observado en las larvas infectadas fue en la mayoría de los casos turquesa, aunque ocasionalmente se recolectaron larvas con una coloración mayormente verde, o turquesa mezclado con verde (Fig. 8).



Figura 8. Larvas de *Culex pipiens* infectadas con iridiscencia verde, turquesa y mezcla de ambas coloraciones.

Observaciones en Laboratorio

El 99 % de las larvas infectadas con iridovirus ($n=170$) se detectó entre el segundo y el cuarto día desde la exposición a las partículas infectivas y solo un 1% fue registrado posteriormente a ese tiempo. El día de mayor registro fue el tercero con 52 % representado del total de larvas infectadas (Tabla 1).

El momento en que sobreviene la muerte de la larva infectada es variable, pudiendo demorar más de 10 días. La muerte de 79 % de las mismas se da antes de los 10 días del inicio de la infección, aunque la mortalidad comienza a ser importante a partir del séptimo día, exhibiendo una mortalidad acumulada del 67% entre el séptimo y el decimo día; 11,7% los días previos (entre el 4to y el 6to) y 21,2% los días posteriores (Tabla 2).

Tabla 1. Día en que comienza a observarse la infección de forma evidente en el ensayo de laboratorio expresado en número de larvas infectadas y porcentaje.

	Día desde el inicio de la infección			
	2 ^{do}	3 ^{er}	4 ^{to}	5 ^{to}
Nº de larvas infectadas	53	88	27	2
% sobre el total (n=170)	31%	52%	16%	1%

Tabla 2. Día en que se produce la muerte de las larvas infectadas por MIV a partir del ensayo, desde el inicio de la infección.

	Día desde el inicio de la infección							
	4 ^{to}	5 ^{to}	6 ^{to}	7 ^{mo}	8 ^{vo}	9 ^{no}	10 ^{mo}	10 +
Nº de larvas muertas por MIV	5	6	9	27	40	25	22	36
% sobre el total (n=170)	2,9 %	3,5%	5,3%	15,9%	23,5%	14,7%	12,9%	21,2%

Cito e histopatología

El ensamble y acumulación de partículas virales tiene lugar en el citoplasma celular. Allí se produce la formación de un estroma virogénico, zona de aspecto homogéneo formada por moléculas virales no ensambladas (Fig.9)

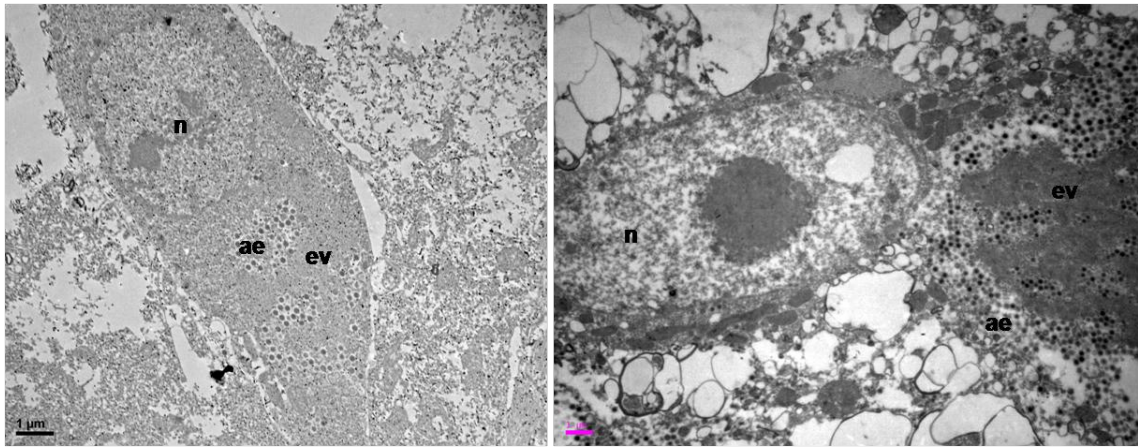


Figura 9. Sitio de replicación del iridovirus en la célula. Se observa núcleo celular (n) libre de partículas virales. En el citoplasma se pueden apreciar aéreas de ensamble viral (ae) y zonas de color homogéneo llamado estroma virogénico (ev).

Mediante microscopía electrónica de transmisión pudo comprobarse la infección del epitelio traqueal (Fig. 10), tejido graso (Fig. 11) y epidermis (Fig. 12). Por otro lado no se evidenció presencia de partículas virales en las fibras musculares (Fig. 13).

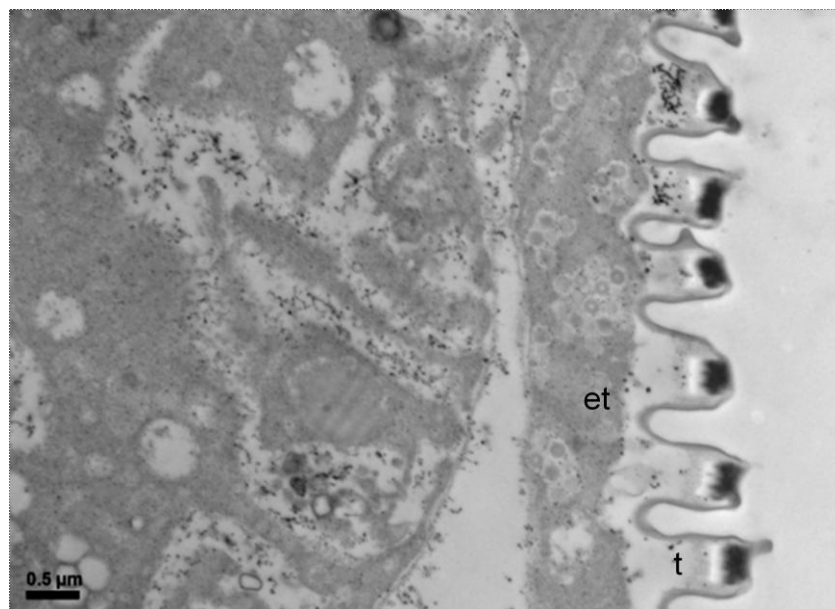


Figura 10. Corte ultrafino longitudinal a nivel del epitelio traqueal (et) y la tráquea (t) de una larva de *Culex pipiens* infectada con iridovirus. Se observan núcleos de replicación en una célula de la tráquea mientras que no hay presencia de partículas virales en las células contiguas.

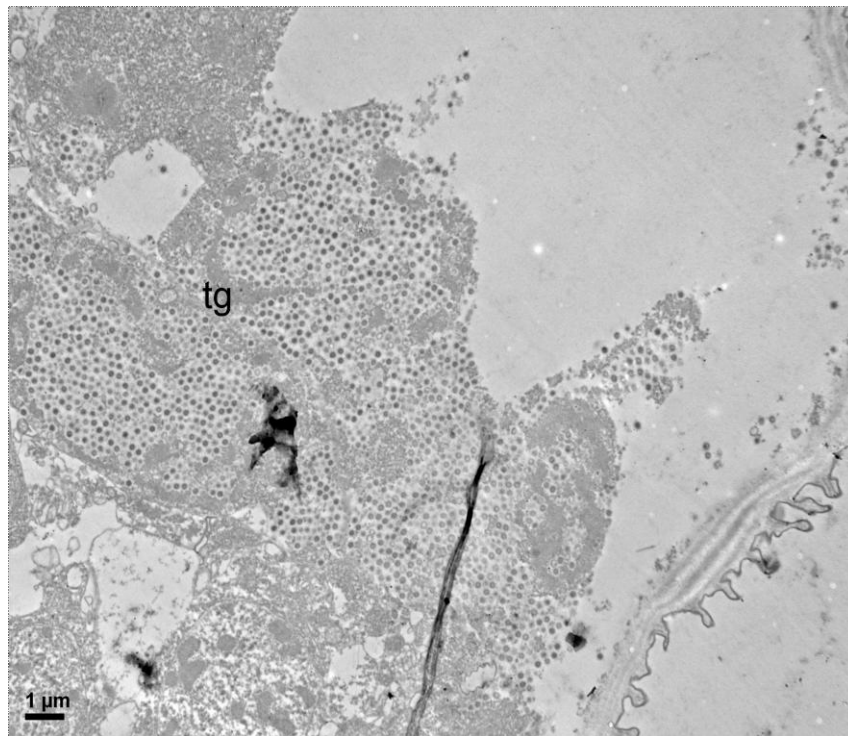


Figura 11. Corte ultrafino de una larva de *Culex pipiens* infectada con iridovirus. Tejido graso (tg) con un gran número de partículas virales.

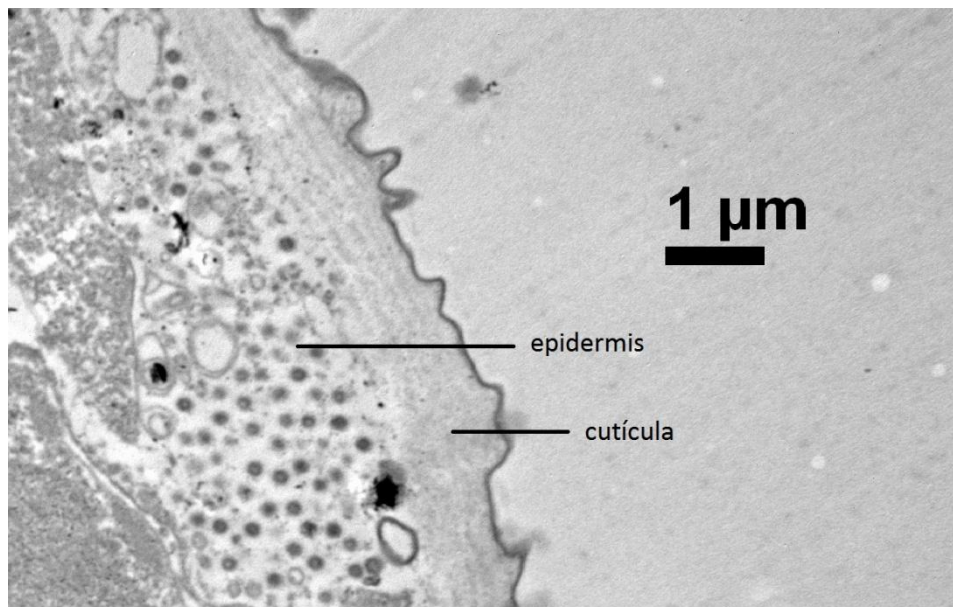


Figura 12. Corte ultrafino de una larva de *Culex pipiens* infectada con iridovirus. Se observa la epidermis. Inmediatamente debajo de la cutícula un gran número de partículas virales en una célula epitelial

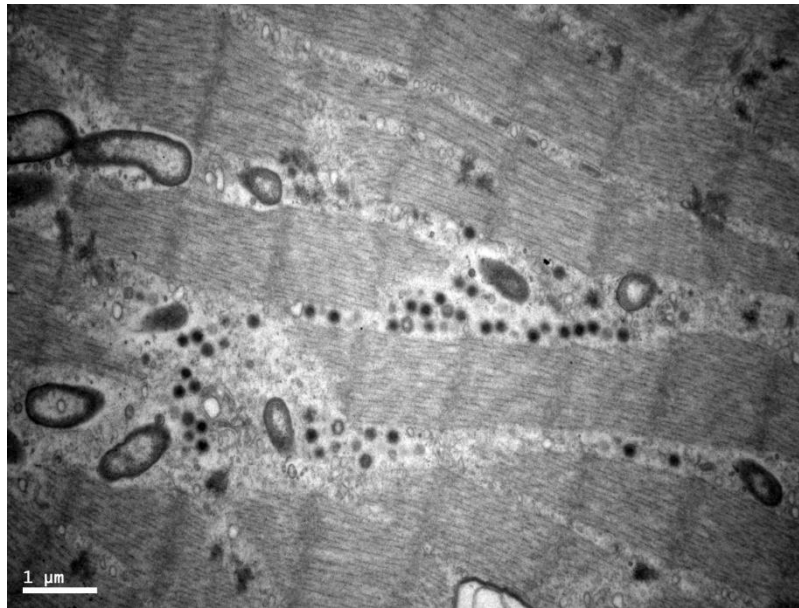


Figura 13. Corte ultrafino del tejido muscular de una larva de *Culex pipiens* infectada con iridovirus. No se observan partículas virales dentro de las fibras musculares.

Discusión

La patología producida por iridovirus en mosquitos de otras especies tiene muchos puntos en común con la producida por el IV de *Culex pipiens*, pero también tiene ciertas diferencias. Dentro de las similitudes se encuentran los principales tejidos infectados y la progresión general de la infección evidente. A pesar de que otros estudios han reportado iridiscencia de colores amarillo y naranja, en nuestro estudio solo se ha reportado en la gama del turquesa y el verde. Se cree que el color está relacionado con el tamaño del virus, donde partículas entre 110 y 130 nm de diámetro se verían turquesa mientras que verde, amarillo o naranja en el rango de 160-200 nm (Williams, 2008). Esta información no es coincidente con el iridovirus de *C. pipiens*, que presenta un tamaño de partícula viral de 158 nm, no obstante la coloración observada es turquesa en la mayoría de los ejemplares. Si bien se ha reportado que la infección viral se hace evidente en la larva de cuarto estadio sin tener en cuenta el momento en que esa larva adquirió la infección (Clark, 1965), en nuestro sistema estudiado es notable la diferencia, dado que la infección se hace evidente a lo sumo un estadio larval posterior al estadio en que se infectó y mueren en el mismo o en un estadio posterior. Por ejemplo, cuando se infectaron larvas de segundo estadio temprano, los ejemplares infectados nunca llegaron a desarrollarse hasta cuarto estadio. Esto podría deberse a que las vías de infección son distintas, ya que en este sistema se utiliza como vía de ingreso el nematodo para introducir el virus, por lo que posiblemente la progresión de la infección sea más rápida. Los tejidos afectados reportados en este estudio resultaron similares a los informados en otros trabajos, aunque no se pudo comprobar la presencia de partículas virales en ganglio, nervios, musculo, esbozos de ovarios y testículos. Sin embargo, se registró replicación viral en glándulas salivales, suceso no reportado hasta el momento en iridovirus de mosquitos. De comprobarse la misma afinidad del virus por las glándulas salivales del mosquito adulto, podría tener importancia el estudio de interferencias de estos patógenos con ciertos arbovirus transmitidos por mosquitos, en el caso de detectar infecciones subletales que permitan la emergencia del estado adulto.

Si bien se observó que la infección se hace evidente primero en el tórax y luego en el abdomen, no queda claro cuál es el mecanismo implicado en la dispersión del patógeno dentro de la larva, ya que al ser el virus vehiculizado por el nematodo, lo esperado sería que la infección se hiciera evidente inicialmente cerca del punto de introducción del mismo. Como es sabido, el nematodo es capaz de penetrar en cualquier sitio de la larva huésped. Una posibilidad es que las partículas virales afecten primero a tejidos afines específicos. En cuanto a esta hipótesis, es de remarcar que también se desconoce el mecanismo de transporte de las partículas virales en el insecto. Al analizar los cortes ultrafinos de una larva luego de 48 hs de iniciada la infección, se evidencian en el tórax gran cantidad de partículas virales, mientras que en el abdomen solo se detecta infección en el epitelio traqueal, no observándose virus en los tejidos circundantes. Infecciones en el epitelio traqueal fueron reportadas y mencionadas como muy importantes por otros autores (Hall y Anthony, 1971). Si bien la microscopía electrónica nos da una visión muy parcial de la situación, también es cierto que las tráqueas son estructuras que recorren todos los tejidos del individuo y las mismas podrían funcionar como vías de dispersión viral. Un mecanismo similar fue propuesto como una ruta de egreso de baculovirus desde el intestino hacia otros tejidos del hospedador, debido a que, en su función respiratoria, es un órgano ramificado que lleva oxígeno a todo el cuerpo del insecto. AcMNPV y *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* (BmMNPV) han sido observados infectando células del epitelio traqueal luego de infecciones en el intestino o infectando otros órganos vía las tráqueas (Engelhard et al., 1994; Kirkpatrick et al., 1994; Rahman y Gopinathan, 2004). Durante el transcurso de la presente tesis se ha intentado comprobar la patología encubierta en larvas de último estadio, en adultos y en su descendencia, obteniendo resultados negativos, aun así, otros estudios deberían realizarse para esclarecer esa parte de la biología del virus.

Capítulo 6

Persistencia del Iridovirus de *Culex pipiens*
en semicampo y laboratorio

Introducción

Los iridovirus han sido escasamente estudiados y poco se sabe acerca de la transmisión y de sus mecanismos para colonizar los ambientes naturales y permanecer en ellos.

Diferentes factores pueden afectar el tiempo en que una partícula viral permanece infectiva, siendo los más relevantes: humedad, radiación UV, temperatura y pH. El iridovirus mas utilizado como modelo para estudios en este sentido ha sido el IIV-6, hallado en lepidópteros y especie tipo del género *Iridovirus*. Observaciones de campo y laboratorio indican que los iridovirus son particularmente sensibles a la desecación ya que no presentan estructuras proteicas protectoras. Estudios realizados sobre la persistencia del IIV-6 en suelo, determinaron que la pérdida de actividad en sedimento seco resulta muy alta a las 24 horas. Por otro lado, no se observa tal disminución en suelos húmedos o mojados, donde la vida media del virus en suelos no esterilizados es de 4.9 días. En el control (virus suspendido), la misma es de 12,9 días y retiene entre 0,72 y 0,87 % de la actividad original a los 90 días, valores significativamente mayores que la actividad retenida en suelo (ensayo realizado a 25°C),(Reyes et al., 2004).

Las partículas del virus IIV-6 mantenidas en buffer de diferentes pH por 20 días y a 25 °C, reducen la infectividad cuando los valores se alejan de 7 y la pierden en ambos extremos de la escala de valores (Marina et al., 2000, Reyes et al., 2004). Por otro lado, la exposición a UV solar resulta en una rápida inactivación del virus IIV-6 en agua, perdiendo la actividad luego de 36 hs con una fluctuación de temperatura de 24 a 41 °C; mientras que la inactivación a la sombra fue menor, perdiendo el 97% de la actividad en 60 hs con una fluctuación de temperatura entre 24 y 31 °C (Hernandez et al., 2005). Si bien en el trabajo comentado anteriormente no se pudo separar el efecto de la luz UV y el de la temperatura por ser un trabajo de campo, se pudo observar en otro estudio, que el efecto de la temperatura no sería tan drástico, por lo menos en niveles no extremos. Para ello se expusieron partículas virales a tres temperaturas (4, 25 y 27 °C) y se determinó la dosis infectiva 50 (DI_{50}) periódicamente hasta llegar a 50 días, momento en el cual la infectividad cayó aproximadamente un orden de magnitud. Aunque la inactivación parece incrementarse con la temperatura, este resultado no fue significativo estadísticamente (Marina et al., 2000).

Otras variables estudiadas no tuvieron impacto sobre la actividad viral, por ejemplo la presencia de ciertos iones. Cuando se testeó la resistencia de partículas virales a Na^+ , Ca^{++} y Mg^{++} 0.02 o 0.1 M, se vio que la presencia de los mismos no tiene efectos significativos (Reyes et al., 2004). Existe solo un estudio al respecto sobre iridovirus de mosquitos, probablemente debido a la dificultad que presenta la transmisión del mismo, ya que el IIV- 3 solo replica en larvas del mosquito *Aedes taeniorhynchus*. En el mismo se vio que la infectividad del IIV-3 en larvas de mosquito cae marcadamente luego de dos días en agua salada a 27°C aunque se registra infección hasta 20 días después; pero cuando es inoculado en suelo, la infectividad cae totalmente a las 48 horas (Linley y Nielsen, 1968b).

El suelo representa un importante reservorio para la mayoría de los virus entomopatógenos. Este mecanismo ha sido reconocido como particularmente importante en baculovirus , entomopoxvirus y cypovirus que forman cuerpos de oclusión para protegerse de la degradación del ambiente, aunque mucho menos se sabe acerca de las habilidades de los virus no ocluidos de permanecer fuera del hospedador (Reyes et al., 2004).

Se presenta en este capítulo un breve estudio sobre la capacidad del iridovirus aislado de *Culex pipiens* de mantenerse infectivo en condiciones de semicampo y laboratorio.

Materiales y Métodos

Ensayo en laboratorio

Se realizó un ensayo en condiciones controladas de temperatura y luz artificial con el objetivo de evaluar cuanto tiempo persiste infectivo el virus en un ambiente controlado.

El ensayo se dividió en dos partes: uno realizado en oscuridad durante 24 hs y otro con fotoperíodo 12hs: 12hs (luz: oscuridad), ambos en incubadora a 25°C. A su vez, cada parte consistió en dos series (Figs. 1 y 2), a una se le colocó un volumen de 40 ml de barro fino esterilizado en autoclave y 260 ml de agua declorinada, mientras que a la otra serie se le colocó solo el agua. El ensayo se realizó por duplicado y con dos controles, uno de la parasitosis y otro con larvas de mosquito sin presencia de patógenos. El control con virus sin la presencia de nematodo no fue realizado por ser considerado no necesario ya que fue demostrada la nulidad de la transmisión por vía oral. Se preparó un conjunto de recipientes por cada semana a evaluar. A los recipientes correspondientes al inicio del ensayo (semana 0) se les agregó 20 larvas sanas de *C. pipiens*, 100 pre-parásitas (J2) de *S. spiculatus* y el inóculo (una larva de *C. pipiens* infectada con virus iridiscente y homogenizada) (Fig. 2). Luego, semanalmente se fueron incorporando las larvas de mosquitos y las J2 a los recipientes correspondientes. La evaluación se realizó a las 72 hs.

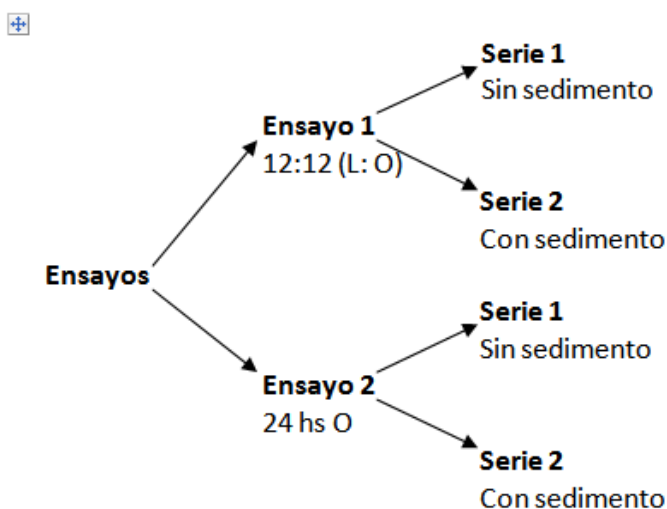


Figura 1. Esquema de la realización del ensayo.

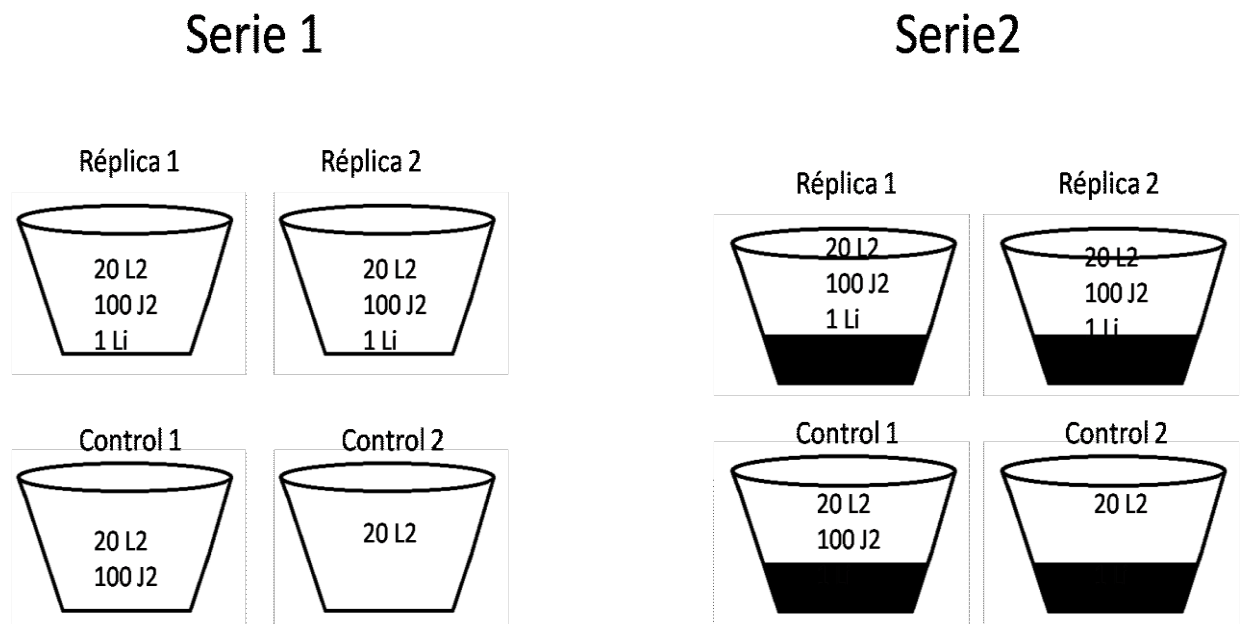


Figura 2. Diseño experimental del ensayo en laboratorio.

Ensayo a semicampo

Este ensayo fue realizado entre los días 11 de mayo y 19 de junio. Para el desarrollo del mismo se seleccionó un sitio protegido por un alero, sin incidencia directa de la luz solar ni de la lluvia. Se registró la temperatura diariamente con un registrador de datos (HOBO datalogger).

El diseño experimental utilizado fue básicamente el mismo que el desarrollado en el ensayo anterior pero se realizó por triplicado y se agregó un control con larvas e inóculo viral, sin presencia del nematodo. El inóculo fue adicionado por única vez al comienzo del ensayo. Se realizó un seguimiento de la infección y luego de dos semanas se volvió a colocar en los recipientes correspondientes larvas de mosquitos y J2s, pero no se agregó inóculo. Se realizó un seguimiento hasta la desaparición por completo de larvas infectadas vivas o muertas.

Resultados

Ensayo en laboratorio

Los resultados muestran que en total oscuridad y a 25°C el virus permaneció infectivo entre 8 y 9 semanas en presencia de sedimento, no ocurriendo lo mismo en ausencia del mismo, en el cual persistió solo por una semana (Tabla 1, Fig. 1). El ensayo con fotoperíodo se realizó hasta la semana 4, observándose una caída de la prevalencia desde 64 a 8% en la serie con sedimento, mientras que en la serie sin sedimento, el virus solamente fue infectivo en la semana 0, con una prevalencia similar a la otra serie (Tabla 1, Fig. 2).

Tabla 1. Prevalencia del virus (%) sobre larvas de *Culex pipiens* en ensayos de resistencia con sedimento y sin él, en incubadora a 25° C con fotoperíodo 12:12 luz-oscuridad (Ensayo 1) y en oscuridad 24 hs (Ensayo 2). Todos los ensayos partieron de un n=20.

	Ensayo 1 (L:O)		Ensayo 2 (O)	
	Serie 1 (s/sedimento)	Serie 2 (C/sedimento)	Serie 1 (s/sedimento)	Serie 2 (C/sedimento)
Semana 0	66	64	58	81
Semana 1	0	19	48	96
Semana 2	0	57	0	43
Semana 3	S/D	S/D	0	25
Semana 4	0	8	0	23
Semana 6	S/D	S/D	0	7
Semana 7	S/D	S/D	0	26
Semana 10	S/D	S/D	0	0

S/D: sin datos

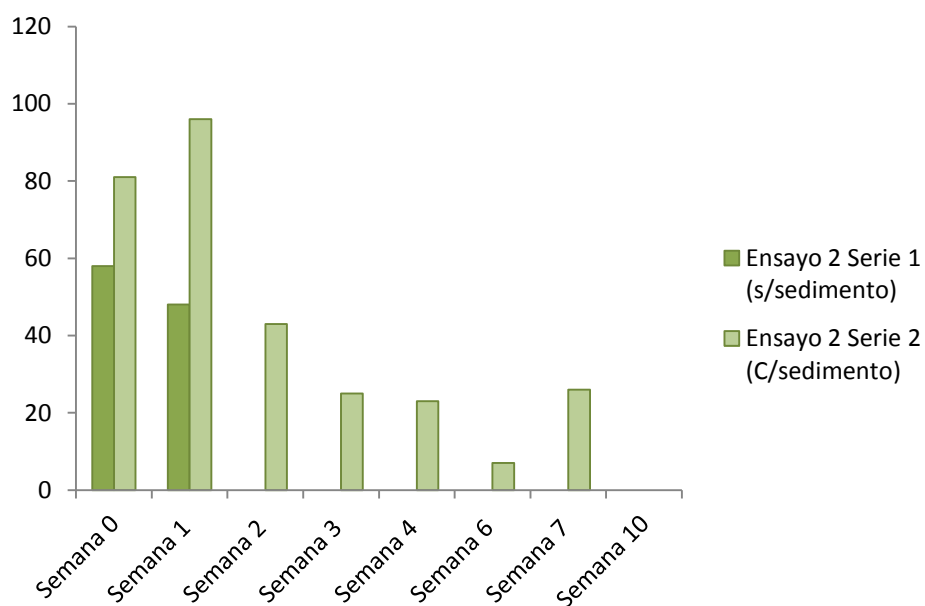


Figura 1. Prevalencia del iridovirus en los ensayos de resistencia de la partícula viral a 25 °C y en oscuridad, comparando las series 1, sin sedimento y la serie 2, con sedimento.

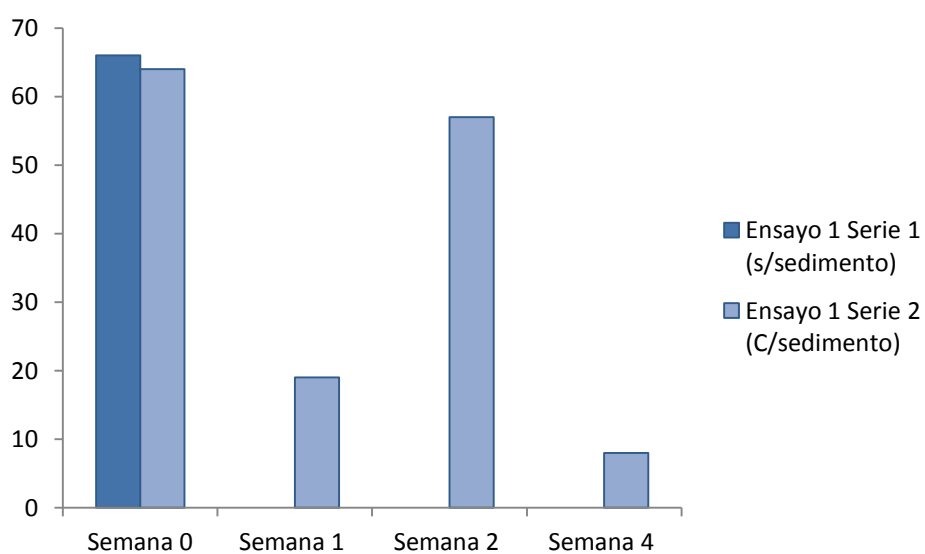


Figura 2. Prevalencia del iridovirus en los ensayos de resistencia de la partícula viral a 25 °C y fotoperíodo 12:12 comparando las series 1, sin sedimento y la serie 2, con sedimento.

Ensayo a semicampo

El ensayo tuvo lugar desde el día 11 del mes de mayo hasta el día 19 de junio. Durante los 39 días que duró el ensayo se realizó un seguimiento periódico de la progresión del mismo. La temperatura promedio registrada durante la primera infección (desde el 11 al 25 de mayo) fue 19,5 °C, mientras que durante la segunda (desde el 26 de mayo al 19 de junio) fue de 13.5 °C.

No se observaron diferencias importantes entre las dos series en los niveles de infección viral y tampoco en la supervivencia de las larvas vivas o infectadas. La aparición de la sintomatología fue simultánea en ambas series y se vio retrasada con respecto a los ensayos de laboratorio a 25 °C. Larvas con infección patente completamente desarrollada fueron registradas a los 5 días desde el inicio del ensayo (11/5) y 11 días después de la reincorporación de larvas sanas y J2 (25/5). Si se comparan estos datos con los tomados en laboratorio a 25 °C se observa una demora de 7 días en la aparición de los síntomas. La muerte de las larvas infectadas fue progresiva, culminando 14 días desde el inicio y 21 días después de la segunda incorporación de larvas sanas. La máxima prevalencia registrada fue 94 % en la primera infección de la serie sin sedimento, aunque no hubo diferencias importantes con la otra serie (Tabla 2).

Tabla 2. Resumen del ensayo a semicampo y sus resultados. Se representan los días y hechos más relevantes tanto de la Serie 1 (S1, sin sedimento) como de la Serie 2 (S2, con sedimento).

	Primera infección			Segunda infección				
	11/5	16/5	25/5	5/6	8/6	11/6	15/6	19/6
S1	Se colocaron L2 (20) y J2 (100) mas el inóculo	Larvas infectadas con sintomatología plena (Prev: 94%, n=52)	Larvas muertas, no infectadas. Se incorporaron L2 y J2	Larvas infectadas (Prev: 53 %, n=19)	Se calculó nuevamente la prevalencia: 36 %, n=11	1 L infectada y 10 L sanas	8 L sanas y 1 L infectada	7 larvas sanas.
S2	Se colocaron L2(20) yJ2(100) mas el inóculo	Larvas infectadas con sintomatología plena (Prev: 88%, n=43)	1 L sana y 1 L infectada muerta. Se incorporaron L2 y J2	Larvas infectadas (Prev: 45 %, n=20)	Se calculó nuevamente la prevalencia: 58 %, n=12	8 L sanas y 3 L infectadas	1 L sana.	1 L sanas.

Discusión

Si bien en incubadora a 25 °C, la infección viral se evidencia a las 72 hs, no ocurrió lo mismo en el ensayo a semicampo donde el promedio de las temperaturas ambientales registradas durante el desarrollo del mismo (16.5 °C) fue 8.5 °C menor. Dado que a bajas temperaturas el metabolismo del insecto disminuye, asimismo se alargarían los procesos de infección viral.

Del ensayo a semicampo se deduce que hubo presencia de inóculo infectivo por ≈37 días, tras la inoculación inicial y con solo una reintroducción de larvas de mosquito y pre-parásitas. La muerte de las larvas infectadas no se da de manera sincrónica, sino que se produce a diferentes tiempos, particulares para cada individuo, posibilitando de esta manera la perpetuación del inóculo en el ambiente. Cuando la larva muere, las partículas virales contenidas en el cadáver permanecen protegidas y retienen la infectividad por un tiempo, estimamos como mínimo dos días (se estableció en isópodos y coleópteros que la infectividad permanece 5 y 14 días respectivamente (Williams et al., 2005)). De esta manera, el virus es capaz de perpetuarse sin necesidad de mecanismos de resistencia de la partícula.

En el ensayo de semicampo no parece tener efecto la presencia de sedimento, obteniéndose resultados similares entre las dos series. Sin embargo, al tener en cuenta los resultados del ensayo de resistencia en laboratorio se observa que es fundamental la presencia de un sustrato para el mantenimiento de la infectividad a largo plazo. En el ensayo con fotoperíodo y ausencia de sedimento, el inóculo produjo infección solo en la semana 0 (Inicio), contrario al ensayo en oscuridad, donde la patogenicidad se extendió hasta la semana 1. Esta diferencia estaría explicada por la radiación UV, a pesar de que este componente es casi nulo en la luz fluorescente. Es sabido que ciertos sustratos pueden proteger a las partículas virales de la radiación UV (Christian et al., 2006), sin embargo, el efecto del sedimento en el mantenimiento de la infectividad en nuestros ensayos parece tener otro origen, si tenemos en cuenta que en el ensayo realizado en oscuridad, donde la luz no es un factor, se observa una diferencia en la supervivencia del virus de al menos 5 semanas entre ambas series. Si bien en nuestros estudios se vio que el sedimento es importante para la persistencia de las partículas

virales, en otro estudio realizado en mosquitos con el IIV-3 se observó el caso contrario. La presencia de un sustrato redujo la infectividad de la partícula a dos días, contra 20 días que sobrevive sin la presencia del mismo. En una publicación en donde se evaluó la afinidad de diferentes partículas virales de insectos a distintos componentes de los suelos arcillosos y la virulencia resultante de la mezcla, se observó que ciertos minerales alteran la prevalencia de las infecciones, incrementando o disminuyendo la actividad, y que esto no necesariamente estaría relacionado con la afinidad de las partículas virales al mineral. Las causas de este suceso no están esclarecidas pero se sabe que son interacciones mineral-virus específicas. Particularmente para el caso de IIV-6 se descubrió que varios minerales, como por ejemplo Hidróxido de aluminio, attapulgita, illita y talco aumentan considerablemente la prevalencia de la infección con respecto a controles sin el mineral y que un componente en particular con baja afinidad por el virus, por ejemplo un tipo de Bentonita, puede favorecer la actividad viral con respecto al control, mientras otro tipo de Bentonita la disminuye (Christian et al., 2006). En nuestro trabajo no se evidencia un incremento de la prevalencia inicial (correspondiente a la primera exposición) en la serie con sedimento con respecto a la serie sin sedimento en todos los ensayos realizados, por lo que al parecer, el tipo de suelo utilizado no tendría el efecto de incrementar ni disminuir la actividad viral. Aunque en el trabajo de Christian et al. (2006) no se evaluó el tiempo de persistencia de las partículas virales en dichos suelos, se sabe que los mismos son reservorios de virus entomopatógenos, sin embargo los mecanismos involucrados aun son poco claros. Es evidente que los minerales son importantes para la biología de los virus, posiblemente existan interacciones benéficas, donde minerales específicos incrementen la estabilidad de los mismos alargando su persistencia o perjudiciales, disminuyendo la misma, como es el caso del IIV-3.

Los resultados expuestos en este capítulo nos brindan una idea del tiempo y la forma en que un iridovirus puede subsistir en un ambiente natural, sin mecanismos de resistencia propios de la partícula. Hay que tener en cuenta en las conclusiones, que el tiempo de resistencia de una partícula en el campo, probablemente sea menor a los resultados obtenidos en el ensayo de laboratorio; debido a que la esterilización del sustrato posiblemente mejore significativamente la persistencia de las mismas. Este

efecto fue reportado por Reyes et al. (2004), quienes asumen que la actividad de los microbios o los agentes sensibles al calor, como las enzimas producidas por los mismos, son responsables de la gran pérdida de actividad de IIV-6 en suelos no estériles comparados con suelos estériles.

Si bien otros autores reportaron una supervivencia de la partícula viral mayor, para el caso de IIV-6 de hasta 90 días (Reyes et al., 2004), hay que tener en cuenta que además de tratarse de un virus diferente con un hospedador terrestre, el método de detección utilizado por los autores de dicha publicación (inyección en larvas de lepidópteros) resulta más sensible al utilizado en el presente estudio, aunque menos cercano a la realidad.

En un ambiente con agua o humedad permanente, donde se encuentran instaladas poblaciones de *Culex pipiens* y de *Strelkovimermis spiculatus*, el iridovirus sería capaz de mantenerse infectivo indefinidamente por dos mecanismos. Por un lado mediante la muerte asincrónica de larvas infectadas, lo que representa una fuente de inóculo para sucesivas infecciones. Por otro lado, la resistencia de la partícula viral en el medio. Los estudios indican que el tipo de suelo puede aumentar el tiempo en que el virus permanece infectivo, ya que protege a la partícula viral de la radiación UV, mantiene la humedad por más tiempo, y por alguna afinidad específica entre el virus y algún componente mineral. Es importante remarcar que las características de la biología de esta especie de mosquito favorecen el establecimiento de este sistema mosquito-parásito-virus, debido a la existencia de generaciones superpuestas. Esta característica permite la presencia simultánea de larvas de primeros estadios que son más susceptibles a la parasitosis y a la infección viral.

Capítulo 7

Estudios del Rango Hospedador del
Iridovirus de *Culex pipiens*

Introducción

El rango hospedador de la familia *Iridoviridae* resulta muy amplio si tenemos en cuenta que afecta gran espectro de animales, tanto vertebrados poiquiloterms como invertebrados. De los hospedadores invertebrados, aproximadamente el 95 % son artrópodos y el resto anélidos, moluscos y un nematodo. En la mayoría de los casos el virus fue detectado en estados inmaduros acuáticos de especies del orden Diptera procedentes de diferentes partes del mundo. Las familias con mayor representación son: Simuliidae, Ceratopogonidae, Tipulidae y Culicidae. En el caso particular de los mosquitos, se han hallado numerosas especies hospedando iridovirus. Los géneros más representados son: *Aedes* y *Psorophora*. Para *Aedes* se hallaron dieciseis especies afectadas, sin incluir *A.aegypti* y *A. albopictus*, en las que no se registraron infecciones naturales con el virus. Para *Psorophora* cuatro y solo una especie registrada para *Culiseta* y *Culex* (Williams, 2008), además de un registro en adultos de *Anopheles* (Huang et al., 2015).

Es importante tener en cuenta que los casos registrados provienen de infecciones patentes y poco se sabe sobre el rango hospedador de la infección subletal.

A diferencia de los baculovirus, los cuales suelen ser muy específicos, a veces llegando al punto de infectar solo una especie particular de hospedador, los iridovirus de invertebrados difieren marcadamente en su rango hospedador. Algunos infectan naturalmente muy pocas especies, por ejemplo IIV-3 (especie tipo del género *Chloriridovirus*), mientras que otras como IIV-6, aislado originalmente de *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae), tienen un rango hospedador más amplio, siendo capaces de infectar numerosas especies de mosquitos, incluyendo a *A. aegypti* (Fukuda, 1971; Marina et al., 2003). Es interesante destacar que especies de *Anopheles*, *Culex* y *Culiseta* son susceptibles al virus IIV-6 en condiciones de laboratorio (Fukuda, 1971) pero no a IIV-3, el que solo afectaría naturalmente al mosquito de agua salada, *A. taeniorhynchus* (Woodard y Chapman, 1968).

El rango de especies en las cuales los IIVs replican parece más restringido en la naturaleza que en el laboratorio, lo cual depende mucho de la ruta de infección y de si se considera una infección letal o una subletal. El iridovirus IIV-22 (especie tentativa

del género *Iridovirus*) no infecta por transmisión *per os* larvas del mosquito *A. aegypti* de manera letal, pero sí de forma subletal, como se comprobó en adultos (Tesh y Andreadis, 1992). Investigaciones sobre el tema parecen indicar que ciertas especies de IIV son capaces de afectar un número de especies hospedadoras simpátricas (Williams et al., 2005). Estudios de laboratorio, en los cuales el virus fue inyectado, indicaron que muchos IIVs pueden infectar especies de diferentes órdenes taxonómicos, incluso diferentes clases (Williams et al., 2005; Ohba y Aizawa, 1979). Un ejemplo de este fenómeno en laboratorio es el virus IIV-22 que, por inoculación intratorácica, puede producir infecciones en especies de diferentes mosquitos, flebótomos y al menos una especie de triatomino (Tesh y Andreadis, 1992). Un ejemplo claro de que un mismo iridovirus puede producir infecciones en organismos pertenecientes a diferentes clases en la naturaleza es el caso de las especies de isópodos, *Porcellio scaber* y *Armadillidium vulgare* parasitados por mermítidos de la especie *Thaumamermis cosgrovei* donde tanto artrópodos como nematodos estaban parasitados con el mismo virus iridiscente (Poinar et al. 1980).

La situación en el campo de la replicación *in vitro* es incluso más compleja debido a que el virus, para infectar las células, no necesita superar barreras del insecto como la epidermis y la matriz peritrófica. Así es como IIV-6 replica en muchas líneas celulares de insectos y puede incluso infectar células de reptiles (Williams et al., 2005). El primer modelo de cultivo celular completo y productivo para miembros del género *Iridovirus* se encontró en células del picudo del algodón *Anthonomus grandis* Boheman. Este modelo se caracterizó por poseer efectos citopáticos claros, producción de títulos altos y múltiples pasajes con rendimientos de infección considerablemente altos (D'Costa et al., 2012). En cuanto al género *Chloriridovirus*, la habilidad de IIV-3 para infectar líneas celulares fue demostrada en 1974 donde se demostró que dos líneas celulares de *A. aegypti* fueron susceptibles a este virus (Webb et al., 1976). Estos cultivos presentaron efectos citopáticos a los 2.5 días después de la inoculación de células mantenidas entre 31 y 35 °C. Los efectos citopáticos observados fueron: apariencia granular, vacuolización y tendencia de las células a formar racimos y filamentos citoplasmáticos (Webb et al., 1974). Las infecciones en ambas líneas celulares fueron confirmadas por microscopía electrónica, pero las partículas propagadas en estos cultivos no fueron

infectivas para larvas de *Aedes taeniorhynchus*. Posteriormente, Becnel et al. (2011) demostraron la susceptibilidad a este virus de las líneas celulares de los mosquitos *Aedes aegypti* (Aag2), *Aedes albopictus* (C6/36) y *Anopheles gambiae* (Giles) (4a3A) así como de una línea del lepidóptero *Spodoptera frugiperda* (SF9), aunque la infección viral permaneció más tiempo en las líneas Aag2 y C6/36. El virus producido en la línea C6/36 fue infeccioso para larvas de *Aedes taeniorhynchus* por inyección y *per-os*. En este capítulo se intenta conocer la capacidad del iridovirus hallado en *Culex pipiens* de replicarse in-vivo en otras especies de mosquito e in-vitro en células de *Aedes albopictus*.

Materiales y Métodos

Susceptibilidad de distintas especies de mosquito al iridovirus de *Culex pipiens*

Se realizaron ensayos de transmisión horizontal utilizando al nemátodo como método para transmitir el virus con el objetivo de comprobar la susceptibilidad de distintas especies de mosquito al iridovirus hallado en *Culex pipiens*. Las especies evaluadas fueron: *Culex apicinus* Philippi, *Aedes crinifer*, *Aedes albifasciatus* (Macquart) y *Aedes aegypti*. El número de larvas de cada especie utilizado en los bioensayos fue variable, dependiendo de la disponibilidad de larvas de segundo estadio a campo. Los controles de la parasitosis fueron llevados a cabo de la forma descrita en el capítulo 3.

Culex apicinus

Las larvas de *C. apicinus* de segundo estadio utilizadas fueron obtenidas de una pileta de recreación en desuso ubicada en la ciudad de La Plata. Se expusieron 20 larvas sanas de *C. apicinus* al inóculo viral (una larva homogenizada de *C. pipiens* infectada con iridovirus) y 100 J2 (segundo juvenil) de *S. spiculatus* por 24 hs, en recipientes de plástico de 30 ml con 25 ml de agua destilada. Luego, las larvas tratadas fueron enjuagadas en agua destilada y transferidas a contenedores plásticos de 300 ml con 150 ml de agua destilada y alimento balanceado para cobayo finamente molido. El ensayo fue evaluado a las 72 horas luego de la exposición y fue registrado el número de larvas vivas e infectadas. Todos los ensayos fueron llevados a cabo a 25 ± 1 °C y fotoperiodo 12:12 (Luz: Oscuridad). Se realizaron tres controles, uno con larvas de *C. apicinus* sin presencia de patógenos, otro con larvas expuestas al virus, y finalmente larvas de mosquito expuestas al nematodo (5:1). Cada ensayo fue realizado por triplicado y repetido tres veces en el tiempo.

Aedes (Ochlerotatus) crinifer

Se colectaron larvas de segundo estadio de *A. crinifer* en charcos de inundación por crecida del Río de La Plata en Punta Lara, Partido de La Ensenada, Provincia de Buenos Aires. Los ensayos fueron realizados pocas horas después de la recolección de las larvas debido a la alta mortalidad de los inmaduros de esta especie en condiciones de laboratorio. El procedimiento fue similar al ensayo anterior. Se realizaron tres réplicas por vez con 20 individuos cada una. El ensayo fue repetido dos veces en distintos tiempos. Se consideraron tres controles, uno con larvas de *A. crinifer* sin presencia de patógenos, un control con larvas expuestas al virus y finalmente larvas de mosquito expuestas al nematodo (5:1). Se utilizaron 20 larvas para cada control.

Aedes (Ochlerotatus) albifasciatus

Se utilizaron larvas recolectadas en charcos de inundación por lluvia ubicados en Punta Lara. El procedimiento fue similar al descrito precedentemente. Se realizaron dos ensayos, el primero con tres réplicas de 20 larvas y el segundo con 6 réplicas de 20 larvas. Dado que en el primer ensayo todas las larvas se hallaron muertas a las 72 horas, se optó por realizar el segundo ensayo con agua del sitio de muestreo. Para el segundo ensayo se utilizó un control con larvas en ausencia de patógenos (20 larvas) y dos controles de los niveles de parasitismo (35 larvas en cada uno).

Aedes (Stegomyia) aegypti

Dada la importancia de esta especie como vector de enfermedades, se realizaron dos series de ensayos de transmisión comparables con los realizados en *C. pipiens* donde las variables involucradas fueron la cantidad de inóculo y la proporción de pre-parásitos y larvas de mosquito. Las larvas utilizadas para estos ensayos fueron obtenidas de una colonia previamente instalada en el CEPAVE (Método de cría estándar ver Apéndice 1).

Metodología general

Se expusieron 20 larvas sanas de segundo estadio de *A. aegypti* al inóculo viral correspondiente y a J2 de *S. spiculatus* por 24 horas, en recipientes de plástico de 30 ml con 25 ml de agua destilada. Luego, las larvas fueron enjuagadas en agua destilada y transferidas a recipientes plásticos de 300 ml con 150 ml de agua destilada y

alimento balanceado para cobayo finamente molido. El ensayo fue evaluado a las 72 horas, registrándose el número de larvas vivas e infectadas. Todos los ensayos fueron llevados a cabo a 25 ± 1 °C y un fotoperiodo 12:12 (Luz: Oscuridad). Los controles colocados son descritos según el caso. Cada ensayo fue realizado por triplicado y repetido tres veces en el tiempo.

Cantidad de inóculo

Los inóculos utilizados fueron: media, una, tres y seis larvas de *C. pipiens* infectadas y homogenizadas. Para usar media larva, una larva infectada fue homogenizada en 500 µl de agua destilada y 250 µl de este homogenato fue utilizado como inóculo. Se realizaron tres controles, un control con larvas expuestas a cada inóculo, larvas de mosquito expuestas al nematodo (5:1) y larvas criadas sin presencia de patógenos.

J2: larva de mosquito

Las proporciones evaluadas fueron 1:1, 3:1, 5:1 y 7:1. Se utilizó una larva de *C. pipiens* infectada como inóculo. Se realizaron tres controles: se expusieron larvas sanas al virus (una larva infectada homogenizada) a las diferentes proporciones de J2 y se criaron larvas sanas sin ningún patógeno.

Susceptibilidad de células de *Aedes albopictus* al iridovirus de *Culex pipiens*

La propagación viral en células de *Aedes albopictus* (línea celular CCL-126) fue realizada en las instalaciones del Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE).

Protocolo de propagación viral en células de mosquito:

Se repicó el frasco stock de células CCL-126 y se abrieron dos nuevos frascos rotulados C1 (control 1) y V1 (virus 1). Al día siguiente, al frasco C1 se le cambió el medio por MEM 1% SBF. Al frasco V1 se le cambió el medio por el que tiene el virus filtrado con MEM 1% SBF, luego de 2 horas se volcó el medio y se agregó nuevamente 1% SBF. Al

tercer día, a partir del frasco C1 se formaron dos nuevos frascos rotulados C2 y V2, con medio 1% SBF.

El frasco V1 con el virus se colocó a -20°C, una vez congelado se descongeló y se centrifugó por 10 min a 2000 rpm para eliminar los restos celulares. El sobrenadante se incorporó al frasco rotulado V2, se dejó por 2 horas y se le cambió el medio por el que tiene 1% SBF. Del mismo modo al frasco C2 se le cambió el medio. El pasaje de virus se realizó dos veces más. Finalmente se congelaron los frascos C4 y V4, se descongelaron y centrifugaron y se guardaron los sobrenadantes en diferentes tubos eppendorf.

Detección del virus en las células de cultivo inoculadas

El ADN del sobrenadante de los tubos C4 y V4 fue purificado mediante extracción estándar con fenol/cloroformo y precipitación con etanol (Sambrook et al., 1989). El pellet final fue disuelto en 20µl de agua bidestilada. Se realizaron dos diluciones de cada una de las extracciones realizadas (1/10 y 1/100). Se realizaron pruebas de PCR con cada una de las cuatro diluciones utilizando los cebadores MIV_Univ_R y MIV_Univ_F (ver Capítulo 2). La amplificación con Taq Polimerasa (Invitrogen) fue llevada a cabo bajo condición estándar (buffer estándar 1X, 0.25 U de Taq ADN polimerasa, MgCl₂ 1.5 mM, BSA 1 mg/ml, 0.2 mM por cada dNTP y 1 µM por cada primer). Se usó el siguiente protocolo de amplificación: desnaturalización inicial de 4 min a 94°C, 35 ciclos de 10 seg a 92°C, de 20seg a 45°C y de 2 min a 72°C seguido de la extensión final de 5 min a 72°C. Se realizó electroforesis en gel de agarosa 1.5 % para visualizar el producto de PCR mediante tinción con bromuro de etidio.

Prueba de virulencia del virus replicado en cultivo celular

Se realizó un ensayo de transmisión in-vivo para comprobar la virulencia del virus replicado en cultivo celular.

Se colocaron 50 larvas de segundo estadio de *C. pipiens*, 250 pre-parásitas (5:1) y parte del sobrenadante proveniente del cultivo celular como inóculo en 6 ml de agua declorinada durante 24 hs. Luego el ensayo fue traspasado a un recipiente con 200 ml

de agua y comida para las larvas. El ensayo fue evaluado a las 72 hs, donde se registró la cantidad de larvas vivas y la cantidad de larvas con infección patente.

Análisis de datos

Para estudiar la significancia de los cambios en las proporciones de larvas infectadas según los distintos tratamientos y las especies de mosquito se proponen modelos lineales generalizados de familia Binomial, estos modelos se caracterizan por ser aditivos y sin interacción.

Resultados

Susceptibilidad de distintas especies de mosquito al iridovirus de *Culex pipiens*

La prevalencia de la infección fue calculada como el número de larvas infectadas sobre el número de larvas vivas al momento de la evaluación.

Culex apicinus

La prevalencia promedio de la infección viral fue 51,8% en larvas de segundo estadio de *C. apicinus* utilizando un inóculo de 1 Li y proporción J2:L2 de 5:1 (Tabla 1.a). En los controles con larvas sanas y con virus, en ausencia del mermítido, no se obtuvieron larvas infectadas (Tabla 1.a). En el control de la parasitosis por *S. spiculatus* en larvas sanas de *C. apicinus* se obtuvo una prevalencia de 13 %. (Tabla 1.b).

Tabla 1.a. Prevalencia del iridovirus en larvas de segundo estadio de *Culex apicinus* (mediante *S. spiculatus*) y sus respectivos controles.

<i>Culex apicinus</i>			
	Nº de larvas expuestas(Total)	Nº de larvas vivas(promedio)	Nº de larvas infectadas(promedio)
Ensayo	180	13,5±4,5	7±3,6
Control larvas	60	12,7±3,5	0
Control virus	60	11,3±4,5	0

Tabla 1.b. Prevalencia de *Strelkovimermis spiculatus* en los controles de la parasitosis en larvas de *Culex apicinus*.

<i>Culex apicinus</i>	Control de la parasitosis	
Nº de larvas expuestas(Total)	Nº de larvas vivas(Promedio)	Numero de larvas parasitadas (Promedio)
60	10±7,2	1,3±1,5

Aedes (Ochlerotatus) crinifer

No fue posible obtener larvas con síntomas de infección viral patente en esta especie de mosquito. Se observó una alta mortalidad larval en condiciones de laboratorio, tanto en los ensayos como en los controles (Tabla 2). En el control con nematodos, las larvas de mosquito murieron antes de que los parásitos pudieran completar su desarrollo (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados de los ensayos de transmisión del iridovirus mediante *Strelkovimermis spiculatus* en larvas de segundo estadio de *Aedes crinifer*.

<i>Aedes crinifer</i>			
	Nº de larvas expuestas (Total)	Nº de larvas vivas (promedio)	Nº de larvas infectadas (promedio)
Ensayo	120	5,7±2,6	0
Control larvas	40	10±1,4	0
Control virus	40	8,5±4,9	0

Aedes (Ochlerotatus) albifasciatus

En el primer ensayo se observó 92 % de mortalidad en los tratamientos a las 48 horas de realizado el ensayo, aun así, se observaron dos larvas muertas que aún presentaban la iridiscencia típica de la infección con iridovirus. En el segundo ensayo realizado íntegramente con agua del sitio de muestreo, aunque se logró disminuir la mortalidad a un 5%, no se obtuvieron larvas infectadas (Tabla 3.a). En el control de la parasitosis se obtuvo una prevalencia de la misma de 49 % (Tabla 3.b)

Tabla 3.a. Resultados de los ensayos de transmisión del iridovirus mediante *Strelkovimermis spiculatus* en larvas de segundo estadio de *Aedes albifasciatus* y el control de larvas sin presencia de patógenos.

<i>Aedes albifasciatus</i>			
	Nº de larvas expuestas (Total)	Nº de larvas vivas (promedio)	Nº de larvas infectadas (promedio)
Ensayo	120	19,8±4,5	0
Control larva	20	20	0

Tabla 3.b. Prevalencia de *Strelkovimermis spiculatus* en los controles de la parasitosis en larvas de *Aedes albifasciatus*.

<i>Aedes albifasciatus</i>	Control del parasitismo	
Nº de larvas expuestas (Total)	Nº de larvas vivas (promedio)	Nº de larvas parasitadas (promedio)
70	33,5±3.5	16,5±2,12

Aedes (Stegomyia) aegypti

Cantidad de inóculo

Cuando se expusieron larvas de *Aedes aegypti* a inóculo viral en cantidades crecientes, se vio que la prevalencia de la infección con iridovirus decrece desde el primer inóculo (57,2% (n=180)) al cuarto inóculo (18,4 % (n=180)) (Fig. 1b). Los promedios entre réplicas de larvas vivas y larvas infectadas para cada tratamiento se muestran en la Tabla 4.a. La mortalidad del control de larvas sanas fue 1.5 % (n=60). En los controles con virus en ausencia del nematodo se obtuvo una larva infectada utilizando el inóculo nº 1 (n=60) (Tabla 4.b). La parasitosis por *S. spiculatus* en el control fue de 77.7 % (Tabla 4.c).

Tabla 4.a. Variación de la infección viral en larvas de *Aedes aegypti* expuestas a inóculo creciente y al nematodo en proporción 5:1 (J2: larva de mosquito).

<i>Aedes aegypti</i>		Ensayo	
Inóculo	Nº de larvas expuestas (Total)	Nº de larvas vivas (promedio)	Nº de larvas infectadas (promedio)
1 ½ Li	180	13,8 ± 7,6	7,9 ± 4,7
2 1Li	180	19,2 ± 1,3	7.7 ± 3,9
3 3 Li	180	19± 0,9	5,2 ± 4,2
4 6 Li	180	19± 1,1 a	3,5 ± 3,4
Control larva	60	19,7±0,6	0

Tabla 4.b. Resultado de los controles con virus en el ensayo con variación de inóculo en larvas de *Aedes aegypti*.

<i>Aedes aegypti</i>		Control virus	
Inóculo	Nº de larvas expuestas (Total)	Nº de larvas vivas(promedio)	Nº de larvas infectadas (promedio)
1 ½ Li	60	19 ± 1,7	0,3 ± 0,6
2 1Li	60	20 ± 0	0
3 3 Li	60	20 ± 0	0
4 6 Li	60	20 ± 0	0

Tabla 4.c. Prevalencia de *S. spiculatus* en los controles de la parasitosis en larvas de *Aedes aegypti*.

<i>Aedes aegypti</i>		Control del parasitismo	
Nº de larvas expuestas (Total)	Nº de larvas vivas (promedio)	Nº de larvas parasitadas (promedio)	
58	19,3±0,6	15±1	

J2: larva de mosquito

Cuando se realizaron infecciones manteniendo constante el inóculo (1 Li) pero variando la proporción J2:L2 resultó que la prevalencia del iridovirus se incrementó desde 12,6 % (n=180) con la proporción más baja (1:1) a 51,9 % (n=180) con la proporción más alta (7:1) (Fig. 1a). La mortalidad promedio en el control con larvas sanas fue de 9% mientras que la mortalidad en el control con inóculo viral fue 8%. No se obtuvieron larvas infectadas en ningún control. Las proporciones promedio entre réplicas con los distintos tratamientos y los controles con larvas sanas y en presencia de virus se muestran en la Tabla 5.a. La prevalencia de *Strelkovimermis spiculatus* en los controles de la parasitosis en larvas de *Aedes aegypti* se presentan en la Tabla 5b.

Tabla 5.a

Variación de la infección con MIV en larvas de segundo estadio de *Aedes aegypti* expuestas al virus y a una proporción creciente de pre-parásitas (J2).

<i>Aedes aegypti</i>		Ensayo	
J2:L2	Nº de larvas expuestas (Total)	Nº de larvas vivas (promedio)	Nº de larvas infectadas (promedio)
1:1	180	17,5±2,3	2,2 ±1,8
3:1	180	17,5±1,7	6,1±1,9
5:1	180	16,5±3	9,2±4
7:1	180	15,8±2,9	8,2±3
Control larva	180	18,2±1,6	0
Control virus	180	18,4±1,5	0

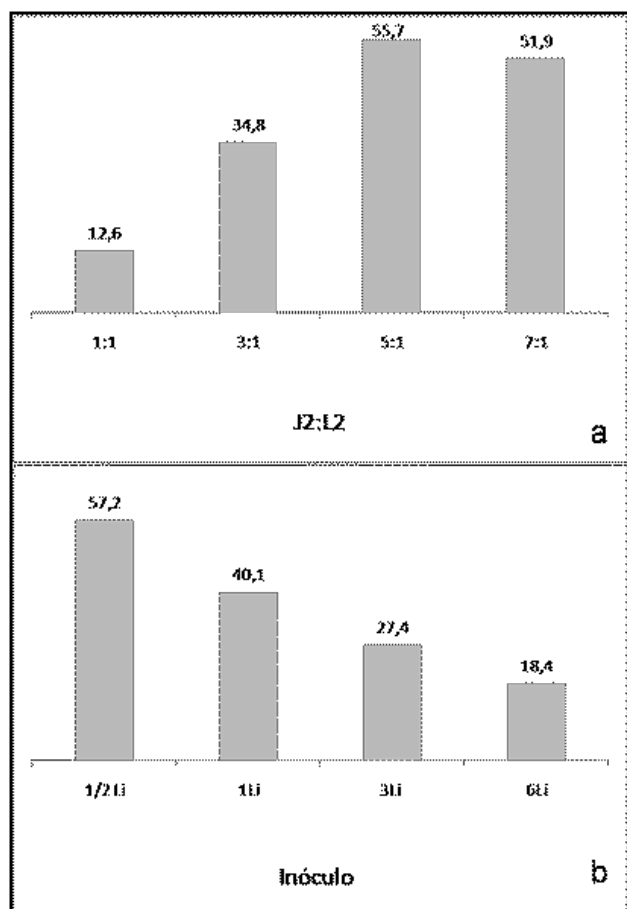


Figura 1. Prevalencia (%) de la infección con MIV en larvas de *Aedes aegypti* mediada por el nematodo *Strelkovimermis spiculatus*. Variación de la susceptibilidad al virus con diferentes proporciones de pre- parásitas (J2): larva de mosquito (L2) (a) y crecientes cantidades de inóculo en forma de larvas infectadas (Li) (b).

Análisis de datos

Comparación de la proporción de larvas infectadas en las especies de mosquito *Aedes aegypti* y *Culex pipiens* en los diferentes tratamientos.

Ensayo de variación del inóculo

Se quiere establecer si hay o no diferencias significativas en la proporción de larvas infectadas de las especies *A. aegypti* y *C. pipiens* sometidas a cuatro inóculos virales manteniendo constante la proporción de nematodo:larva de mosquito (5:1). En base al total de los datos (Tabla 6) se calcularon las proporciones de infectadas sobre vivas (Tabla 7).

Tabla 6

Conteo total de larvas infectadas y vivas en los ensayos con diferentes inóculos en larvas de *Aedes aegypti* y *Culex pipiens*.

Inóculo	<i>Aedes aegypti</i>		<i>Culex pipiens</i>	
	# L. vivas	# L. infectadas	# L. vivas	# L. infectadas
1	124	71	142	122
2	173	69	140	104
3	171	47	138	73
4	171	32	156	68
Total general	639	219	576	367

Tabla 7

Proporciones calculadas a partir de los datos de la tabla 6.

Inóculo	<i>A.aegypti</i>	<i>C. pipiens</i>	Total
1	0,573	0,859	0,726
2	0,399	0,743	0,553
3	0,275	0,529	0,388
4	0,187	0,436	0,306
Proporción del total	0,343	0,637	0,482

Para estudiar los cambios en las proporciones de larvas infectadas según los distintos inóculos y especies de mosquito se propone un modelo lineal generalizado de familia Binomial sin interacción. La figura 2 muestra intervalos de confianza de 95 % y descarta la posibilidad de interacciones entre especies y tratamientos. No obstante se probó analíticamente la ausencia de interacción.

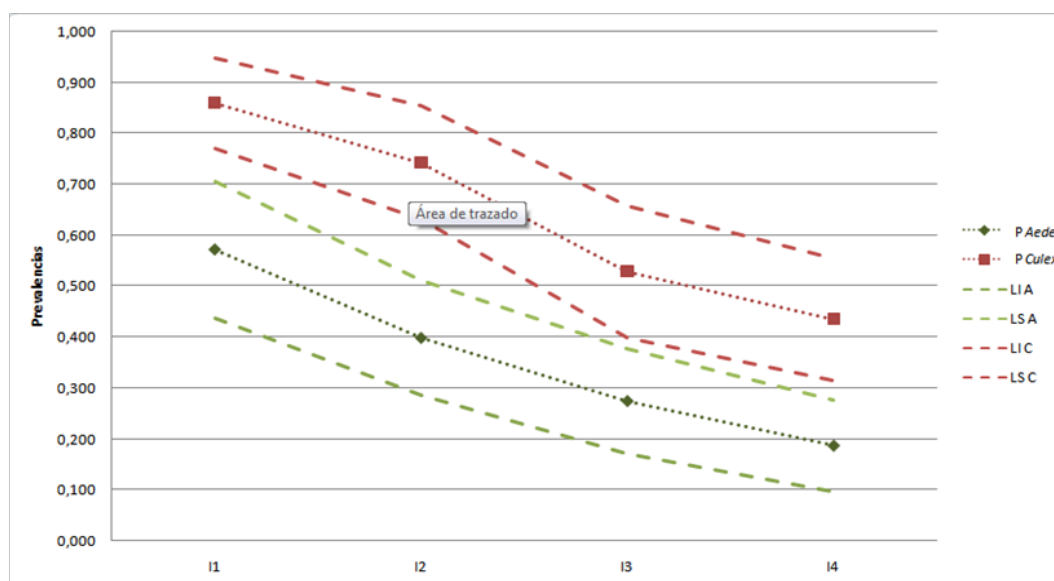


Figura 2. Comparación entre las prevalencias de MIV en *Culex pipiens* (p *Culex*) y *Aedes aegypti* (p *Aedes*) variando la cantidad de inóculo con intervalo de confianza de 95% (LI =límite inferior, LS=límite superior).

El modelo propuesto es el siguiente:

$$\log\left(\frac{p}{1-p}\right) = \beta_0 + \beta_1 I_{Clx} + \beta_2 I_{I2} + \beta_3 I_{I3} + \beta_4 I_{I4}$$

Donde:

p=probabilidad de estar infectado

I_{Clx} = 1 si la especie es *Culex*, 0 en otro caso

I_{I2} = 1 si el inóculo es el 2, 0 en otro caso

I_{I3} = 1 si el inóculo es el 3, 0 en otro caso

I_{I4} = 1 el inóculo es el 4, 0 en otro caso

Por lo tanto el inóculo 1 se identifica cuando $I_{I2} = I_{I3} = I_{I4} = 0$ y la especie *A.aegypti* se identifica cuando $I_{Cix} = 0$.

El modelo arrojó los siguientes resultados

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
β_0 : interceptor	0,371	0,152	2,450	0,014
β_1 : <i>Culex</i>	1,305	0,129	10,122	0,000
β_2 : I_2	-0,716	0,186	-3,838	0,000
β_3 : I_3	-1,452	0,189	-7,675	0,000
β_4 : I_4	-1,896	0,192	-9,859	0,000

	exp.beta	LI 95%	LS 95 %
Exp(β_0)	1,450	1,077	1,951
Exp(β_1)	3,687	2,864	4,747
Exp(β_2)	0,489	0,339	0,705
Exp(β_3)	0,234	0,161	0,339
Exp(β_4)	0,150	0,103	0,219

Efecto del cambio de la especie en las chances de infección:

El cambio en las posibilidades de ser infectado por el iridovirus al pasar de la especie *A.*

aegypti a *C. pipiens* está dado por:

$$e^{\beta_1} = \frac{\text{odd}(\text{infectado en Culex})}{\text{odd}(\text{infectado en Aedes})} = 3,69$$

Es decir que las posibilidades de una larva de *C. pipiens* de estar infectada es casi 4 veces las chances de una larva de *A. aegypti* aun sosteniendo la misma proporción de pre-parásitas sobre larvas de mosquitos.

Efecto de los inóculos comparados entre sí:

	Estimador	Estimación	IC 95%: LI *	IC 95%: LS *
OR(I2/I1)	e^{β_2}	0,489	0,339	0,705
OR(I3/I1)	e^{β_3}	0,234	0,161	0,339
OR(I4/I1)	e^{β_4}	0,150	0,103	0,219
OR(I3/I2)	$e^{\beta_3 - \beta_2}$	0,479	0,315	0,727
OR(I4/I2)	$e^{\beta_4 - \beta_2}$	0,307	0,201	0,470
OR(I4/I3)	$e^{\beta_4 - \beta_3}$	0,641	0,418	0,984

*Los niveles de significación fueron ajustados por Bonferroni para que la significación global sea de a lo sumo 5%.

Se observa una disminución significativa de las chances de infección de cualquier inóculo respecto al I1, con disminuciones de 51% para I2, 77% para I3 y 85% para I4. Respecto a I2 hay disminución significativa tanto de I3 como de I4, en 52% y 70% respectivamente; si bien las chances de infección de I4 respecto a I3 también muestran una disminución de 36%, el extremo derecho del intervalo de confianza está muy próximo a 1 lo que lleva a pensar en una diferencia poco contundente.

Conclusiones

Las estimaciones obtenidas comparando *Culex pipiens* y *Aedes aegypti* muestran que hay diferencias significativas en las posibilidades de infección con iridovirus entre ambas especies, siendo *Culex* la que más chances de infección tiene (en promedio casi 4 veces las posibilidades de *Aedes*) (Fig. 3). Al no haber interacción, el efecto es constante para cada tipo de inóculo. Sin importar la especie, salvo entre los inóculos 3 y 4, el resto muestra diferencias en las chances de infección. Además, la estimación de los parámetros evidencia que tales posibilidades disminuyen desde el inóculo 1 sucesivamente hasta el inóculo 4.

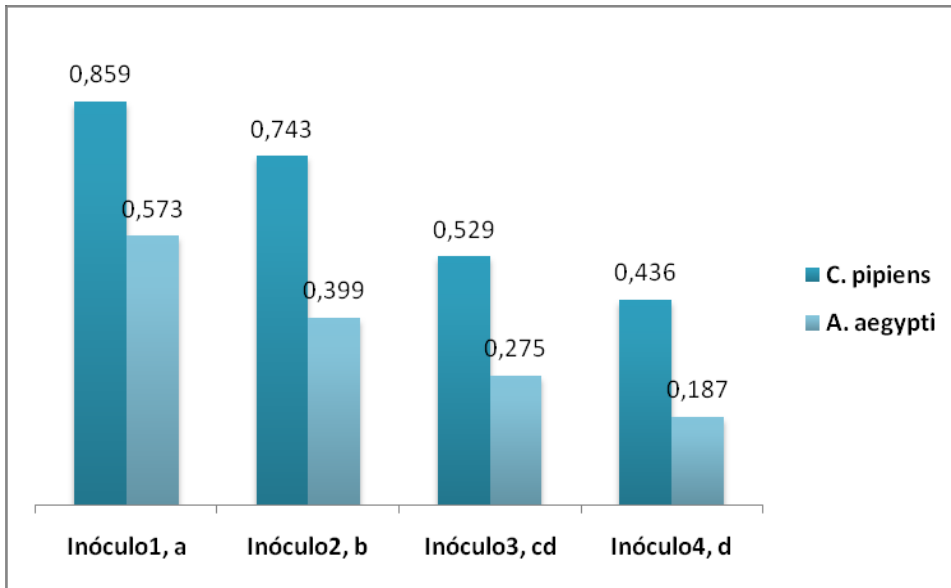


Figura 3. Comparación de la proporción de larvas infectadas con iridovirus en el ensayo con variación de inóculo viral para ambas especies. Los inóculos seguidos de una misma letra no son significativamente diferentes según el modelo binomial aplicado.

Ensayo de variación de la proporción del nematodo

Se quiere establecer si hay o no diferencias significativas en la proporción de larvas infectadas de las especies *A. aegypti* y *C. pipiens* sometidas a cuatro proporciones diferentes de J2: larva de mosquito. En base al total de los datos (Tabla 8) se calcularon las proporciones de infectadas sobre vivas (Tabla 9).

Tabla 8

Conteo total de larvas infectadas y vivas en los ensayos con diferentes proporciones J2:L2 en *Aedes aegypti* y *Culex pipiens*.

Nematodos	<i>Aedes aegypti</i>		<i>Culex pipiens</i>	
	# Vivas	# Infectadas	# Vivas	# Infectadas
1:1	158	20	173	66
3:1	158	55	167	101
5:1	149	83	165	125
7:1	142	74	154	136
Total general	607	232	659	428

Tabla 9

Proporciones calculadas a partir de los datos de la tabla 8.

Nematodes	<i>A.aegypti</i>	<i>C. pipiens</i>
1:1	0,1266	0,3815
3:1	0,3481	0,6048
5:1	0,5570	0,7576
7:1	0,5211	0,8831
Proporción del total	0,3822	0,6495

Para estudiar los cambios en las proporciones de larvas infectadas según las distintas proporciones de J2: larva de mosquito utilizada y según la especie de mosquito, se propone un modelo lineal generalizado de familia Binomial.

Se propuso el siguiente modelo:

$$\log\left(\frac{p}{1-p}\right) = \beta_0 + \beta_1 I_{Clix} + \beta_2 I_{3:1} + \beta_3 I_{5:1} + \beta_4$$

donde:

p=probabilidad de estar infectado

I_{Clix} = 1 si la especie es *Culex*, 0 en otro caso

$I_{3:1}$ = 1 si el inóculo es el 2, 0 en otro caso

$I_{5:1}$ = 1 si el inóculo es el 3, 0 en otro caso

$I_{7:1}$ = 1 el inóculo es el 4, 0 en otro caso

Por lo tanto el inóculo 1 se identifica cuando $I_{3:1} = I_{5:1} = I_{7:1} = 0$ y la especie *Aedes* se identifica cuando $I_{Clix} = 0$.

Se comenzó con un modelo completo que incluyó interacción, pero fue descartado por los resultados correspondientes a esos parámetros.

El modelo arrojó los siguientes resultados:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
β_0 : interceptor	-1,815	0,157	-11,589	0,000
β_1 : <i>C. pipiens</i>	1,279	0,129	9,922	0,000
β_2 : nemat3:1	1,068	0,176	6,079	0,000

β_3 : nemat5:1	1,883	0,183	10,282	0,000
β_4 : nemat7:1	2,128	0,190	11,205	0,000

	exp.beta	LI 95%	LS 95 %
Exp(β_0)	0,163	0,120	0,221
Exp(β_1)	3,593	2,791	4,626
Exp(β_2)	2,909	2,062	4,104
Exp(β_3)	6,573	4,591	9,412
Exp(β_4)	8,399	5,788	12,187

Cuando se trata de la proporción 1:1, el modelo estima en 0.14 la probabilidad de que larvas de la especie *A. aegypti* estén infectadas. A continuación se detallan las estimaciones de los cambios en las chances de infección para todos los casos.

Efecto del cambio en la especie para las chances de infección:

El cambio en las chances de ser infectado al pasar de la especie *A. aegypti* a *C. pipiens* está dado por

$$e^{\beta_1} = \frac{\text{odd}(\text{infectado en Culex})}{\text{odd}(\text{infectado en Aedes})} = 3,59$$

Es decir que las chances de las larvas de *C. pipiens* de estar infectadas son casi 4 veces las chances de *A. aegypti* de estar infectadas. Al no haber interacción esta relación se mantiene para cualquier tratamiento.

Efecto de las proporciones J2: larva de mosquito:

	Estimador	Estimación	IC 95%: LI *	IC 95%: LS *
OR(N3/N1)	e^{β_2}	2,909	2,062	4,104
OR(N5/ N1)	e^{β_3}	6,573	4,591	9,412
OR(N7/ N1)	e^{β_4}	8,399	5,788	12,187
OR(N5/ N3)	$e^{\beta_3 - \beta_2}$	2,260	1,489	3,429
OR(N7/ N3)	$e^{\beta_4 - \beta_2}$	2,887	1,872	4,454
OR(N7/ N5)	$e^{\beta_4 - \beta_3}$	1,278	0,819	1,992

*Los niveles de significación fueron ajustados por Bonferroni para que la significación global sea de a lo sumo 5%.

Se observan aumentos significativos en las chances de infección para todas las proporciones respecto a la relación 1:1; para la relación 3:1 triplican las chances, para 5:1 son casi 7 veces más y para 7:1 casi 8 veces.

Al comparar las chances de 5:1 y 7:1 respecto de 3:1 también se verifican aumentos significativos. En el primer caso algo más de 2 veces y en el segundo casi se triplica.

No se detecta diferencia significativa entre las chances de las relaciones 7:1 respecto a 5:1.

Conclusiones

Las estimaciones obtenidas con este modelo muestran que hay diferencia en las chances de infección entre ambas especies, siendo *C. pipiens* la especie con más chances de infección (en promedio casi 4 veces las chances de *A. aegypti*). Al no haber interacción ese efecto es constante para cada relación de nematodos. Sin importar la especie, salvo entre las proporciones 5:1 y 7:1, el resto muestra diferencias en las oportunidades de infección (Fig. 4). Además la estimación de los parámetros evidencia que tales chances aumentan desde la relación 1:1 sucesivamente hasta la relación 7:1 independientemente de la especie de mosquito en cuestión.

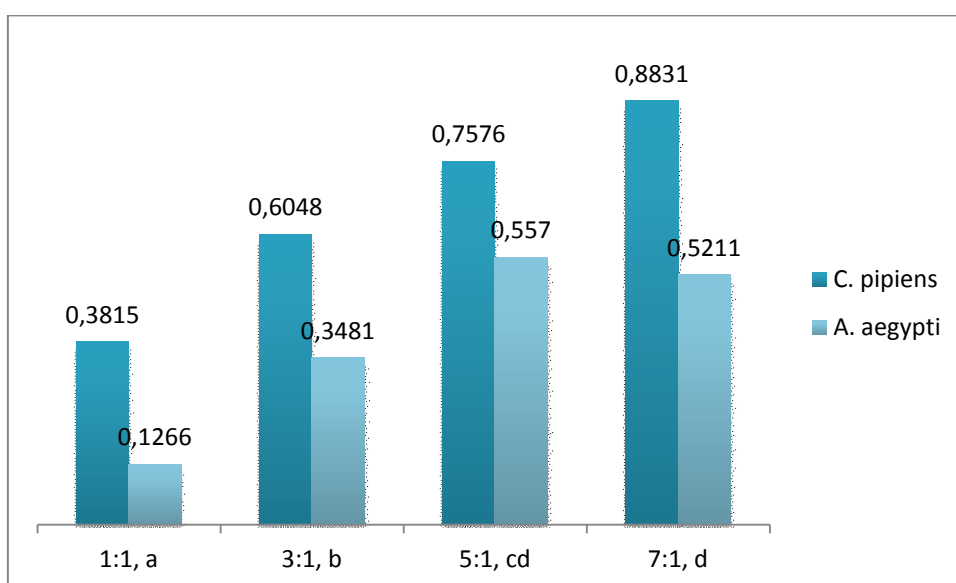


Figura 4. Comparación de la proporción de larvas infectadas con iridovirus en el ensayo con variación de la proporción J2: L2 para ambas especies. Las proporciones seguidas de una letra en común no son significativamente diferentes según el modelo binomial aplicado.

Evaluación de las diferencias en la prevalencia del virus entre las especies *Culex pipiens*, *Culex apicinus* y *Aedes aegypti*.

Se compara el ensayo realizado en *C. apicinus* con los correspondientes en *C. pipiens* y *A. aegypti* donde se utilizó el inóculo 2 (1Li) y 5:1 (J2: larva de mosquito).

Resumen de datos:

Especie	Infectadas	Vivas	Proporción
<i>A.aegypti</i>	69	173	0,399
<i>C.apicinus</i>	63	122	0,516
<i>C. pipiens</i>	104	140	0,743
Total general	236	435	0,543

Tomando como categoría de referencia a *Aedes* se estimaron los parámetros del modelo lineal generalizado de familia binomial:

$$\log\left(\frac{p}{1-p}\right) = \beta_0 + \beta_1 I_{Api} + \beta_2 I_{Pi}$$

Donde:

p=probabilidad de estar infectado

I_{Api} = 1 si la especie es *C. apicinus*, 0 en otro caso

I_{Pi} = 1 si la especie es *C. pipiens*, 0 en otro caso

Por lo tanto la especie *A.aegypti* se identifica cuando $I_{Api} = I_{Pi} = 0$.

El modelo arrojó los siguientes resultados:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
β_0 : interceptor	-0,41	0,155	-2,642	0,008
β_1 : Apicinus	0,476	0,239	1,994	0,046
β_2 : Papiens	1,471	0,248	5,932	<0,0001

	exp.beta	LI 95%	LS 95 %
Exp(β_1)	1,61	1,008	2,569
Exp(β_2)	4,35	2,678	7,08
Exp($\beta_2 - \beta_1$)	2,71	1,609	4,548

Conclusiones

Las proporciones de la infección en un ensayo equivalente para *Culex pipiens*, *Culex apicinus* y *Aedes aegypti* son significativamente distintas entre sí, confirmando que en estas condiciones las chances de infección son más altas para larvas de *C. pipiens* seguido por larvas de *C. apicinus* y siendo *A. aegypti* la especie que menos posibilidades de infección presenta (Fig. 5a). En la figura 5b se presenta una comparación de las respectivas prevalencias de los nematodos en los controles.

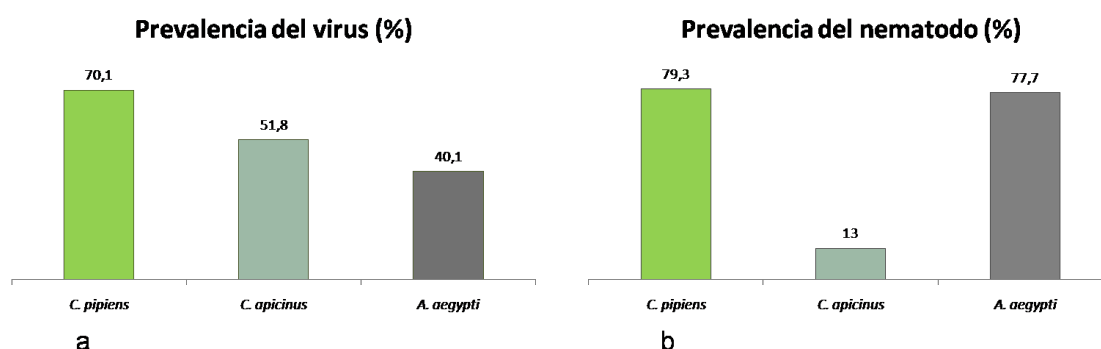


Figura 5. Comparación entre las prevalencias del virus entre tres especies (*Culex pipiens*, *Culex apicinus* y *Aedes aegypti*) en los ensayos donde se expusieron larvas de segundo estadio al inóculo viral (1 larva infectada homogenizada) y nematodos pre-parásitos en proporción 5:1 por 72 hs. (a) y las respectivas prevalencias del nematodo en los controles (b).

Susceptibilidad de células de Aedes albopictus (línea celular CCL-126) al iridovirus de Culex pipiens

Detección del virus en las células de cultivo inoculadas

El virus fue inoculado en células de *A. albopictus*. Se realizaron tres pasajes tras los cuales, las células fueron congeladas, descongeladas y centrifugadas. El sobrenadante fue sujeto a extracción de ADN. La amplificación por PCR de un fragmento del gen de la proteína mayor de la cápside viral dio resultado positivo dado que se obtuvo una banda de aproximadamente 300 bp. La amplificación con la muestra de cultivo celular control sin virus arrojó resultados negativos. Las células en cultivo inoculadas no presentaron efectos citopáticos evidentes.

Prueba de transmisión in-vivo del virus replicado en cultivo celular

En el ensayo de transmisión in- vivo, las larvas expuestas al virus obtenido por congelación y centrifugación de las células inoculadas fueron evaluadas a las 72 hs y no presentaron signos de infección patente.

Discusión

Los resultados muestran que utilizando pre-parásitas de *Strelkovimermis spiculatus* como vehículo, el iridovirus de *Culex pipiens* podría potencialmente infectar numerosas especies de mosquitos del mismo género así como de otros. Estos resultados encuentran similitud con estudios en los que el virus fue transmitido mediante microinyección, un mecanismo directo de entrada al insecto, y se logró obtener de esta manera un amplio rango hospedador. Por ejemplo, en un trabajo publicado por los autores Tesh y Andreadis (1992), se logró mediante este mecanismo transmitir exitosamente el IIV-22 a seis especies de mosquitos, flebótomos y triatominos.

Mediante el presente estudio se logró infectar de manera evidente tres especies de mosquitos: *Culex apicinus*, *Aedes aegypti* y *Aedes albifasciatus*. Los resultados obtenidos en *C. apicinus* y *A. aegypti* fueron comparados con los obtenidos para *C. pipiens* en el Capítulo 3 (Fig. 5a). En los ensayos de transmisión del virus en *A. aegypti*, aunque se detectaron diferencias significativas en las proporciones de larvas infectadas con respecto a *C. pipiens*, se observa que la tendencia de la variación es la misma, aumentando la prevalencia con la proporción J2:L2 y disminuyendo con el aumento del inóculo en ambas especies.

Según los datos arrojados por el modelo binomial, hay diferencias significativas en las prevalencias del virus entre *C. pipiens*, *C. apicinus* y *A. aegypti*, en donde la especie hospedadora natural *C. pipiens*, tiene casi cuatro veces más chances de infectarse que *A. aegypti*. Esto se puede interpretar a priori como una consecuencia de un diferente nivel de parasitismo entre las especies de mosquitos evaluadas, donde se infectaría en menor proporción la especie con menor ingreso del parásito a la larva. Si observamos la Figura 5a se observa la disminución de la prevalencia del virus desde *C. pipiens* a *A. aegypti* pasando por *C. apicinus*, pero cuando se observa la figura 5b se puede notar que las prevalencias del nematodo no acompañan la tendencia del virus, siendo menor para *C. apicinus* y casi iguales para las otras dos especies. La similitud en las prevalencias del parasitismo en *C. pipiens* y *A. aegypti* está en concordancia con un

estudio realizado por Achinelly y Camino (2005), en el cual se determinó que no hay diferencias significativas en las prevalencias del parásito entre ambas especies. Por este motivo se descarta que la diferencia en las prevalencias se deban a una cuestión del parásito como medio de ingreso del virus al mosquito, al contrario, dichas diferencias parecen estar vinculadas a cuestiones relacionadas a los mecanismos propios del virus.

Si bien la infección en *A. albifasciatus* solo se detectó en larvas muertas, la sintomatología de la infección fue clara y muestra que aunque en muy baja proporción, la infección en esta especie es posible. Vale destacar, que en el caso de esta especie, fueron halladas ocasionalmente larvas infectadas con un iridovirus en extensos estudios de campo previos a la presente tesis (datos no publicados). Es de remarcar que esta especie de mosquito se encuentra asociada a grandes charcos de inundación que representan sitios de cría del nematodo *Strelkovimermis spiculatus* (Micieli y García, 1999, Campos y Sy, 2003), mostrando nuevamente una asociación temporo-espacial entre ambos patógenos. Tanto en campo como en laboratorio la proporción de larvas infectadas por el iridovirus parece ser baja, esto podría responder a una cuestión natural de susceptibilidad de la especie o a diferentes factores ambientales. Los sitios de cría para el mosquito *A. albifasciatus* son charcos de inundación temporarios con períodos de sequía largos, esto reduciría o imposibilitaría la supervivencia de la partícula viral en el ambiente (ver Capítulo 6). Por otro lado, tanto el mosquito como el parásito no tienen superposición de generaciones (como es el caso de *C. pipiens*) lo que implica que no habría renovación constante de inóculo viral fresco. Estos factores son importantes para comprender la ausencia de infecciones permanentes con iridovirus en este tipo de ambientes.

Para el caso de *Aedes crinifer* (especie sin registro natural de iridovirus), no fue posible infectar larvas de esta especie con el virus ni con el nematodo, aunque este resultado negativo debería ser repetido con un número mayor de réplicas que permitan una correcta evaluación de la infección.

En el campo de la replicación in-vitro se obtuvieron resultados similares a estudios anteriores. Se pudo comprobar por PCR la infección viral en células de *A.albopictus*, aunque al no observarse lisis celular, este sistema no pudo ser utilizado para realizar

ensayos de placa. Las partículas virales extraídas del cultivo no fueron infectivas en el ensayo in-vivo en larvas de *C. pipiens*.

Conclusiones

|

Objetivos 1y 2: Prospección e identificación de virus entomopatógenos

-Se identificó por primera vez en Argentina la presencia de un virus que según sintomatología y métodos ópticos pertenecería al género *Deltabaculovirus* de la familia *Baculoviridae* en una población del mosquito *Aedes (Ochlerotatus) crinifer* de Ensenada, Buenos Aires.

-Se logró identificar por sintomatología, métodos ópticos y moleculares la presencia de un virus de la familia *Iridoviridae* en una población del mosquito *Culex pipiens* en una zanja de drenaje domiciliario ubicada en Berisso, Buenos Aires, Argentina. Este constituye el primer reporte mundial de un virus iridiscente en larvas de *C. pipiens* y de MIV en la región Neotropical.

-Se obtuvo la secuencia de una región conservada del iridovirus de *C. pipiens*. Según el análisis filogenético de la secuencia de la proteína MCP comparada con otros seis taxa pertenecientes a diferentes géneros de la familia *Iridoviridae*, el MIV de *C. pipiens* estaría más cercano a la especie tipo del género *Chloriridovirus* que a la especie tipo del género *Iridovirus*, y alejado de los iridovirus de vertebrados.

Objetivo 3: Patología

-La sintomatología (iridiscencia) se hace evidente inicialmente en el tórax de la larva, en el 80 % de los casos, entre las 48 y las 72 hs de la exposición de las larvas al virus. La intensidad de la misma aumenta progresivamente hacia el abdomen hasta cubrir todo el cuerpo. La muerte de las larvas se produce en el mismo o a lo sumo en un estadio posterior al que se infectó. Esto sucede, en el 79 % de los casos, 10 días después de comenzada la infección.

-Los tejidos infectados detectados fueron: el cuerpo graso, la epidermis y el epitelio traqueal. También se detectó infección en esófago y glándulas salivales.

Objetivo 4: Trasmisión horizontal

-La transmisión horizontal del virus en laboratorio, mediante ingestión y por laceraciones, resultó casi nula.

Debido a que se comprobó una fuerte asociación a campo entre la infección viral y el parasitismo por *Strelkovimermis spiculatus*, se estudió la transmisión horizontal del iridovirus mediada por *S. spiculatus*, la cual resultó en altas prevalencias. La infectividad viral aumenta significativamente con la proporción de nematodos, disminuye significativamente con el estadio larval y por algún motivo, aún no esclarecido, disminuye al aumentar el inóculo.

-Dado que no fue posible detectar el nematodo en el interior de todas las larvas infectadas con el virus, no se descarta una vía de transmisión alternativa.

-La relación *parasitismo-infección viral* resulta ser directa por lo que se descarta una entrada del virus casual a través del orificio dejado por el mermítido a su paso.

-Observaciones de las formas pre-parásitas expuestas al MIV muestran acarreo de partículas virales sobre la cutícula. Al parecer, las mismas presentarían algún tipo de adhesión. De esta manera el parásito al penetrar la cutícula, ingresaría el virus directamente al hemocele de la larva.

-Mediante un experimento sencillo que incluye múltiple parasitismo, se demostró que el primer parásito que ingresa al mosquito hospedador sin el virus es el que llegaría, en algunos casos, a estar en condiciones de emerger, mientras que los nematodos que ingresan con el virus se ven afectados de alguna manera, muriendo o al menos deteniendo su crecimiento.

-Observaciones de campo y laboratorio nos llevan a pensar que los nematodos son susceptibles al virus en alguna etapa de su ciclo vital, pero no fue posible detectar focos de infección viral dentro de los nematodos en ninguna etapa del ciclo evaluada.

Objetivo 5: Persistencia de la partícula viral

-En total oscuridad y a 25°C el virus permaneció infectivo entre 8 y 9 semanas en agua con sedimento, no ocurriendo lo mismo en ausencia del mismo, en el cual persistió solo por una semana.

-En presencia de luz artificial se observó una caída de la prevalencia desde 64 a 8% en cuatro semanas en la serie con sedimento, mientras que en la serie sin sedimento, el

virus solamente fue infectivo en la semana 0, con una prevalencia similar a la otra serie.

- Es fundamental la presencia de un sustrato para el mantenimiento de la infectividad a largo plazo.

- El virus introducido en un ambiente de cría natural de *Culex pipiens* puede mantenerse infectivo por un tiempo muy prolongado aun sin tener mecanismos propios de protección de la partícula viral. Esto es debido a que la muerte de las larvas infectadas se da de manera asincrónica, posibilitando la perpetuación del inóculo en el ambiente. Además, las partículas virales contenidas en el cadáver permanecen protegidas y retienen la infectividad durante varios días.

Objetivo 6: Estudios de rango hospedador

- Otras especies de mosquito que se lograron infectar con el iridovirus de *C. pipiens* de manera evidente y utilizando a *S. spiculatus* como transmisor fueron: *Culex apicinus*, *Aedes albifasciatus* y *Aedes aegypti*.

- En los ensayos de transmisión del virus en *C. pipiens*, *C. apicinus* y *A. aegypti* se detectaron diferencias significativas en las chances de infección con iridovirus, siendo la especie origen la más susceptible. Por otro lado, las chances de infección en *A. aegypti* son casi cuatro veces más bajas con respecto a *C. pipiens*. Se descartó que esta diferencia en las prevalencias se deba a una cuestión del parásito como medio de ingreso del virus al mosquito. Las mismas parecen estar vinculadas a cuestiones relacionadas a los mecanismos propios del virus.

- Se pudo comprobar por PCR que células de *Aedes albopictus* en cultivo son susceptibles al iridovirus, aunque no se observaron efectos citopáticos. Las partículas virales extraídas del cultivo celular no fueron infectivas en el ensayo in-vivo en larvas de *C. pipiens*.

Conclusión general y Perspectivas futuras

Conclusión General

Sumado al conocimiento de dos nuevos entomopatógenos en Argentina, pudimos comenzar un estudio profundo del iridovirus hallado en *Culex pipiens*, una temática aun inexplorada en nuestro país. Se avanzó en el conocimiento de un sistema particular en donde interviene además un tercer organismo, el nematodo mermítido *Strelkovimermis spiculatus*. Los estudios de transmisión arrojaron diferencias muy importantes con los realizados en la especie tipo del género *Chloriridovirus*. En nuestro sistema fueron obtenidas prevalencias muy altas, esperables para un buen agente de control biológico, sin embargo, el hecho de que un parásito actúe como vector del virus plantea inconvenientes para la utilización del mismo para tal fin. En el caso de que el mermítido pudiera ser instalado en un ambiente de cría de culícidos, también sería necesaria la introducción de gran cantidad de inóculo para obtener en el campo las mismas prevalencias que las obtenidas en laboratorio. Sin embargo, pudimos avanzar en el conocimiento de la patología, la transmisión, la persistencia de este tipo de virus que afecta a los culícidos, y que puede estar involucrado en procesos reguladores de las poblaciones con posibles implicancias futuras.

Perspectivas futuras

El desarrollo de la presente tesis deja planteados diferentes interrogantes que pueden ser el inicio de futuras investigaciones. A continuación se proponen brevemente algunas de las áreas temáticas, derivadas de este trabajo.

Una de ellas, que se encuentra actualmente en proceso de estudio, es la secuenciación total del genoma del iridovirus de *Culex pipiens* y el estudio de la variabilidad genética entre aislamientos de distintos sitios de cría de mosquitos así como aislamientos que presentaron una sintomatología peculiar en la coloración de la iridiscencia. El conocimiento del genoma total resultará muy importante dado que solo se conoce, hasta el presente, la secuencia completa de una sola especie de *Chloriridovirus*, el IIV-3. Por otro lado, para profundizar en estudios de la replicación viral y la transmisión entre células sería necesario encontrar una línea celular permisiva para el virus que permita el mantenimiento de la infectividad a través de los sucesivos pasajes.

Otro aspecto necesario de profundizar son las vías alternativas de transmisión. En este sentido queda por comprobar y esclarecer las vías de transmisión vertical y la patología producida por la infección subletal, mecanismos que pueden ser considerados como reguladores de las poblaciones de culícidos.

Dado que el iridovirus fue hallado en las glándulas salivales de las larvas de mosquito, debería estudiarse con mayor profundidad la posibilidad de que este virus pueda desarrollarse en las glándulas salivales del adulto y así interferir con flavivirus transmitidos por ellos.

Otro interrogante aun no resuelto es el motivo por el cual la presencia de un sustrato es tan importante para la persistencia de las partículas virales. Debería comprobarse la existencia de algún tipo de afinidad virus-sustrato específica o la presencia de alguna forma de protección mecánica que el mismo pudiera ejercer sobre las partículas.

Apéndice 1

Cría y mantenimiento de mosquitos en cautiverio

Cría de *Culex pipiens*

La metodología de cría estandar utilizada tanto de *Culex pipiens* como de *Aedes aegypti* se basó en Gerberg et al, 1994.

La colonia de *C. pipiens* fue instalada partiendo de estados inmaduros colectados en zonas suburbanas de Berisso y La Plata. Las larvas recolectadas fueron revisadas para descartar la presencia de patologías. Luego se ingresaron a un insectario en condiciones de temperatura (25 ± 1 °C) y luz controlada (fotoperiodo 12:12, luz: oscuridad). Se colocaron en bandejas plásticas con agua declorinada y alimento balanceado para cobayo finamente molido (Fig. 1a). Al llegar al último estado de desarrollo inmaduro, las pupas fueron traspasadas a un recipiente pequeño que fue colocado dentro de una primera jaula recubierta con tela mosquitera (llamada Jaula de emergencia) (Fig. 1b) donde las larvas pasaron al estado de pupa y posteriormente emergieron los adultos. Para permitir la alimentación sanguínea, los mosquitos fueron colectados mediante el uso de un aspirador a batería y liberados en una segunda jaula llamada jaula de adultos (Fig. 1b). Allí se colocó una gallina viva tres veces por semana durante 1 hora. Las jaulas fueron provistas de agua y se les ofreció pasas de uva como una fuente de hidratos de carbono. Tres días después de la alimentación sanguínea se colocó un recipiente negro con agua para la puesta de huevos en forma de balsas. Los mismos fueron recolectados y traspasados a una bandeja con agua y alimento para comenzar nuevamente el ciclo. Una diferencia importante que presentan los huevos

de *C. pipiens* comparados con los de *Aedes aegypti* es que no pueden ser almacenados en seco. En cambio es posible retrasar la eclosión por un plazo de hasta 3 días, manteniendo las balsas en agua a $\approx 4^{\circ}\text{C}$, posterior a ese tiempo los huevos se tornan inviables.



Figura 1. Insectario instalado en el CEPAVE. Estantería con bandejas con agua donde se produce la emergencia de las larvas y se crían hasta alcanzar el estado de pupa (a). Jaulas donde emergen los adultos y se les provee alimentación sanguínea (b).

Cría de *Aedes aegypti*

Se inició una colonia con ejemplares inmaduros colectados en diferentes sitios de La Plata. El procedimiento estándar fue similar al utilizado para la especie *C. pipiens*. Las larvas fueron colocadas en bandejas dentro de un insectario y se continuó con el procedimiento hasta obtener los adultos. Los mismos fueron alimentados de la misma forma aunque se redujo el tiempo de exposición a solo 30 minutos, dado que esta especie de mosquito es más propensa a alimentarse en cautiverio debido a su hábitat alimentario diurno. Para la puesta de huevos se utilizaron ovitrampas. Las mismas constan de un recipiente negro, con agua en su interior, al cual se coloca por dentro con papel grueso corrugado de manera que parte del mismo quede sumergido. Los huevos fueron colocados sobre el papel húmedo justo sobre la interface del agua. Luego de la puesta, los papeles fueron retirados y se les dejó secar, pero manteniendo cierta humedad. Los mismos fueron guardados en bolsas plásticas herméticas y almacenados por un lapso prolongado, inclusive meses. Para el mantenimiento de la colonia, parte de los papeles con huevos fueron colocados semanalmente en bandejas con agua y alimento y se continuó con la cría utilizando el método anteriormente descrito.

Apéndice 2

Strelkovimermis spiculatus(Nematoda, Mermithidae): Características de la especie Cría y mantenimiento en laboratorio

Características del nematodo *Strelkovimermis spiculatus*

Características generales y Antecedentes

Strelkovimermis spiculatus es un nematodo perteneciente a la familia Mermithidae. Los integrantes de esta familia se caracterizan por ser parásitos obligados, aunque con la particularidad de desarrollar parte de su ciclo fuera del hospedador. Los hospedadores son organismos del Phylum Artropoda tanto terrestres como acuáticos. En particular, la especie *S. spiculatus* fue aislada por primera vez de larvas del mosquito *Aedes (Ochlerotatus) albifasciatus* en La Plata, Argentina (Poinar and Camino, 1986) y representa el único registro neotropical del género. Años después fue hallado parasitando larvas de *Culex pipiens* en los alrededores de la ciudad de La Plata (García and Camino, 1990).

Ciclo de vida

El ciclo vital de *S. spiculatus* se caracteriza por poseer estadios libres y parásitos. Del huevo emerge un juvenil pre-parásítico (J2) que busca activamente a su hospedador. El J2 entra al hemocele de la larva de mosquito penetrando a través del tegumento por cualquier parte del cuerpo o a través del sifón. El juvenil parásito crece y se alimenta hasta que muda a tercer juvenil (J3) para luego emerger como juvenil post-parásítico (J4), ocasionando en el proceso la muerte del hospedador. El J4 se entierra en el sedimento y madura sexualmente. Allí también tiene lugar la reproducción sexual y la puesta de huevos (Camino and Reboredo, 1994) (Fig. 1). Estos ciclos pueden

desarrollarse tanto en cuerpos de agua efímeros como permanentes. Un ejemplo del primer caso son los charcos de inundación producidos por lluvias. En este tipo de hábitat el nematodo se halla asociado a la especie de mosquito *A. albifasciatus*. En cuerpos de agua permanentes, como ser algunas zanjas domiciliarias, el parásito suele estar asociado a *C. pipiens*. En el caso de los ambientes efímeros el huevo debe resistir más tiempo que el necesario para completar la embriogénesis, a veces tiempos largos de sequia para luego eclosionar con una nueva inundación.

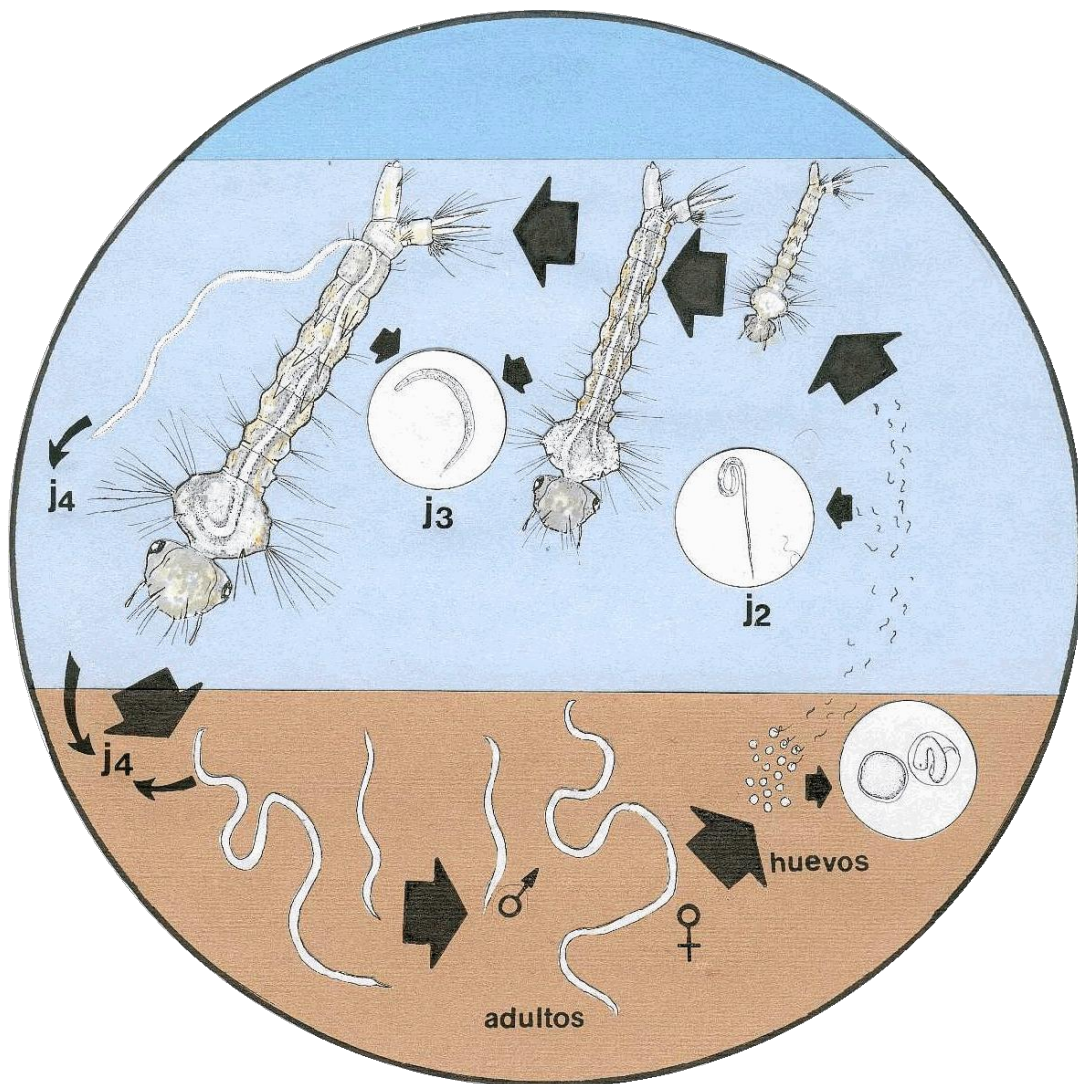


Figura 1. Esquema del ciclo de vida de *Strelkovimermis spiculatus*. Del huevo depositado bajo tierra eclosiona el segundo juvenil (J2) o pre-parásita. El J2 muda dentro de la larva de mosquito a tercer juvenil (J3) y este a cuarto juvenil (J4). El J4 emerge de la larva y le produce la muerte. Los pos-parásitos se entierran, maduran sexualmente, copulan y ponen huevos. Cedido por la Dra. Fernanda Achinelly.

Método de cría

La colonia de *S. spiculatus* fue iniciada a partir de larvas del mosquito *A. albifasciatus* parasitadas provenientes de Punta Lara, Ensenada. Las larvas fueron acondicionadas en bandejas y criadas de forma estándar hasta completar el último estadio larval (ver apéndice 1), momento en el cual fueron traspasadas a recipientes especiales donde emergieron los nematodos pos-parásitos llamadas bandejas de emergencia. Las mismas constan de una maya plástica que permite el paso de los nematodos hacia el fondo del recipiente quedando en la parte superior las larvas de mosquito y los adultos que puedan haber emergido (Fig. 2).

Los juveniles fueron recuperados, se filtraron con agua limpia para quitar restos de alimento para larvas y colocados en cajas con arena gruesa cubierta de agua (Fig. 3). Una vez que los juveniles se enterraron naturalmente se procedió a la extracción del agua libre con una pipeta. Las cajas con arena húmeda y juveniles pos-parásitos fueron introducidas en bolsas herméticas para evitar la pérdida de humedad (Fig. 4) y fueron colocadas en un lugar oscuro durante al menos cuatro semanas para permitir la maduración sexual, la copula y la oviposición. Para producir la eclosión de las formas pre-parásitas (J2) se inundaron las cajas 24 horas antes de ofrecerles larvas huéspedes (Fig. 5). Las J2 fueron contadas por dilución, bajo lupa binocular sobre una placa de vidrio (Fig. 5) con luz incidiendo desde abajo. Posteriormente se colocaron en un recipiente con agua junto con larvas de mosquito en proporción 5:1 (J2: larva de mosquito) durante 24 horas, tiempo estimado de ingreso de las pre-parásitas a la larva de mosquito (Camino y Reboredo, 1994). Luego, las larvas parasitadas fueron criadas en bandejas y el procedimiento continuó como fue anteriormente descrito.

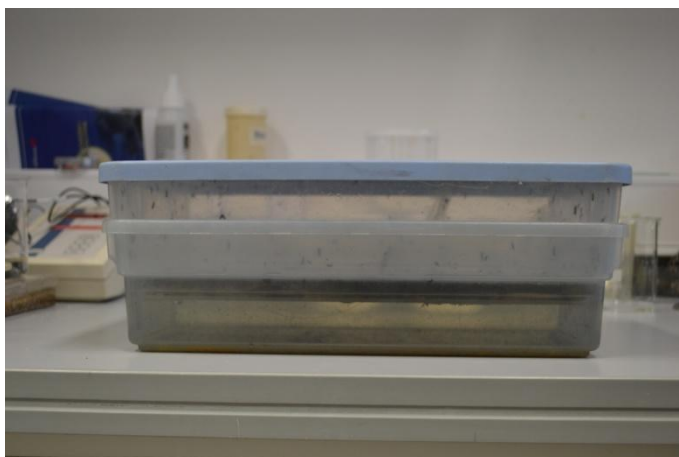


Figura 2. Jaula de emergencia de los nematodos pos-parásitos. En el recipiente superior se depositan las larvas de mosquito parasitadas con *S. spiculatus*. Cuando el parásito emerge atraviesan la malla plástica que divide ambos recipientes



Figura 3. Juveniles post-parásitos enterrándose en la arena gruesa inundada de la caja de cría.



Figura 4. Caja con arena húmeda donde se mantienen los nematodos adultos de *Strelkovimermis spiculatus* preparadas para ser almacenadas.



Figura 5. Colonia inundada para producir el nacimiento de las formas pre-parásitas junto a la cual se observan los elementos utilizados para el conteo por dilución de los juveniles pre-parásitos.

Abreviaturas

μl: microlitros

BV: Budded virus (virus brotante)

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético, agente quelante

IIV: invertebrate iridiscent virus (virus iridiscente de invertebrados)

IIV-3: Invertebrate iridescent virus type 3 (virus iridiscente de invertebrados tipo 3)

ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses

IV: iridiscent virus (virus iridiscente)

J2: segundo juvenil o forma pre-parásita

Kpb: kilo pares de bases

L: larva de mosquito

Li: larva infectada

MCP: major capsid protein (proteína mayor de la cápside)

MEM: minimum essential medium (medio de cultivo celular esencial mínimo)

MET: microscopio electrónico de transmisión

MIV: mosquito iridiscent virus (virus iridiscente de mosquitos)

nm: nanómetros

NPV: nucleopolihedrovirus

OB: occlusion body (cuerpos de oclusión)

ODV: occlusion-derived virions (virus derivado del cuerpo de oclusión)

PCR: polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)

rpm: revoluciones por minuto

SBF: suero bovino fetal

SDS: dodecilsulfato sódico, tensioactivo

Publicaciones resultantes de la presente investigación

- Muttis, E., Miele, S. A. B., Ghiringhelli, P. D., Belaich, M. N., Micieli, M. V, Becnel, J. J., García, J. J., 2012. First record of a mosquito iridescent virus in *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). *Archives of Virology* 157 (8): 1569-1571.
- Muttis, E., Micieli, M. V., García, J. J., 2013. *Culex pipiens* affected by joint infection of a mosquito iridescent virus. *Journal of invertebrate pathology* 114: 295-297.
- Muttis, E., Micieli, M. V., Urrutia, M. I., García, J. J., 2015. Transmission of a pathogenic virus (*Iridoviridae*) of *Culex pipiens* larvae mediated by the mermithid *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda). *Journal of invertebrate pathology* 129: 40-44.

Bibliografía citada

Achinelly, M. F., Camino, N. B., 2005. Evaluation of the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) as alternative hosts for laboratory mass-rearing of *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda: Mermithidae). *Nematology* 7(2) : 281-284.

Achinelly, M. F., Micieli, V. M., 2011. Optimizing laboratory production of *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda: Mermithidae) with a discussion of potential release strategies for mosquito biological control. *Biological Control* 57: 31-36.

Adams, J. R., Bonami, J. R., 1991. Introduction and classification of viruses of invertebrates. *Atlas of Invertebrate Viruses* 1-8.

Almirón, W. R., Brewer, M. M., 1995. Preferencia de hospedadores de Culicidae (Diptera) recolectados en el centro de Argentina. *Revista de Saúde Pública* 29: 108-114.

Almirón, W. R., Díaz, A., Spinsanti, L., Ré, V., Visintín, A., Farías, A., Contigiani, M. S., 2006. *Culex pipiens quinquefasciatus* y su relación con la encefalitis de San Luis en Córdoba, Argentina. *Revista Argentina de Zoonosis* 3: 24-27.

Alves, R., Sanscrainte, N. D., Viviani, A. D. B. P., dos Santos, P. F., de Souza, P. A. V. M., de Carvalho, I. M. V. G., Becnel, J. J., 2012. Occurrence and phylogenetic characterization of a baculovirus isolated from *Culex quinquefasciatus* in São Paulo State, Brazil. *Archives of virology* 157(9): 1741-1745.

Anderson, J. F., 1970. An Iridescent Virus Infecting the Mosquito *Aedes stimulans*. *Journal of Invertebrate Pathology* 15: 219-224.

Becnel, J. J., 1997. Complementary techniques: preparations of entomopathogens and diseased specimens for more detailed study using microscopy. En: Lacey LA (ed) ,Manual of techniques in insect pathology. Academic Press, San Diego, pp 337–353.

Becnel, J. J., White, S. E., Moser, B. A., Fukuda, T., Rotstein, M. J., Undeen, A. H., Cockburn, A., 2001. Epizootiology and transmission of a newly discovered baculovirus from the mosquitoes *Culex nigripalpus* and *Culex quinquefasciatus*. *Journal of General Virology* 82:275–282.

Becnel, J. J., 2006. Transmission of viruses to mosquito larvae mediated by divalent cations. *Journal of Invertebrate Pathology* 92: 141-145.

Becnel, J. J., White, S. E., 2007. Mosquito pathogenic viruses-The last 20 years. En: Biorational Control of Mosquitoes. Floore, T.G. (ed), Supplement to the *Journal of American Mosquito Control Association*. 23 (2) Bull. No 7, pp.:36-49.

Becnel, J.J., Pridgeon, J.W., 2011. Susceptibility of mosquito and lepidopteran cell lines to the mosquito iridescent virus (IIV-3) from *Aedes taeniorhynchus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 108: 40-45.

Benz, G.A., 1986. Introducción: Historical Perspectives. En: R.R. Granados y B.A. Federici (ed.), *The biology of baculoviruses: biological properties and molecular biology*, Vol.1. Academic Press, San Diego, pp 1-36

Blissard, G. W., Rohrman, G. F., 1990. Baculovirus diversity and molecular biology. *Annual Review of Entomology*. 35:127-155.

Boletines integrados de vigilancia. Ministerio de Salud de la Nacion.
<http://www.msal.gob.ar/index.php/home/boletin-integrado-de-vigilancia>

Brewer, M., Buffa, L., Almirón, W., 1987. *Culex pipiens quinquefasciatus* y *Culex pipiens pipiens* (Diptera: Culicidae) en Córdoba, Argentina. *Revista. Peruana de Entomologia*. 29: 69-72.

Cabrera, A. L., Willink, A., 1980. Regiones Biogeografía de América Latina (E Chesneau, ed.). Secretaría de la Organización de los Estados Americanos, Programa de Desarrollo Científico y Tecnológico, Vol 8, pp: 29-107.

Camino, N. B., García, J. J., 1992. Algunos factores que afectan el parasitismo de *Strelkovimermis spiculatus* Poinar y Camino, 1986 (Nematoda: Mermithidae), en mosquitos (Diptera: Culicidae). *Neotropica* 38(99): 75-80.

Camino, N. B., Reboredo G. R., 1994. Biología de *Strelkovimermis spiculatus* Poinar y Camino, 1986 (Nematoda: Mermithidae) parásito de mosquitos (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio. *Neotrópica* 40: 45-48.

Campos, R. E., Maciá, A., García, J. J., 1993. Fluctuaciones estacionales de culícidos (Diptera) y sus enemigos naturales en zonas urbanas de los alrededores de La Plata, Provincia de Buenos Aires. *Neotrópica* 39:55-56.

Campos, R. E., Sy, V. E., 2003. Mortality in Immatures of the Floodwater Mosquito *Ochlerotatus albifasciatus* (Diptera: Culicidae) and Effects of Parasitism by *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda: Mermithidae) in Buenos Aires Province, Argentina. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 98 (2): 199-208.

Carter, J. B., 1973. The mode of transmission of *Tipula* iridescent virus II. Route of infection. *Journal of Invertebrate Pathology* 21: 136-143.

Chapman, H. C., Clark, T. B., Woodard, D. B., Kellen, W. R., 1966. Additional hosts of the mosquito iridescent virus. *Journal of Invertebrate Pathology* 8: 545-546.

Chapman, H. C., Clark, T. B., Anthony, D. W., Glenn, F. E. Jr., 1971. An Iridescent virus from larvae of *Corethrella brakeleyi* (Diptera: Chaoboridae) in Louisiana. *Journal of Invertebrate Pathology* 18 (2): 284-286.

Chinchar, V. G., Hyatt, A., Miyazaki, T., Williams, T., 2009. Family Iridoviridae: poor viral relations no longer. En: James L. Van Etten (ed.), *Lesser Known Large dsDNA Viruses* Berlin Heidelberg, pp. 123-170.

Chinchar, V. G., 2002. Ranaviruses (family *Iridoviridae*): emerging cold-blooded killers. *Archives of virology*, 147(3): 447-470.

Christian, P. D., Richards, A. R., Williams, T., 2006. Differential Adsorption of Occluded and Nonoccluded Insect-Pathogenic Viruses to Soil-Forming Minerals. *Applied and environmental microbiology*. 72(7): 4648–4652.

Clark, T. B., Kellen, W. R., Lum, P. T. M., 1965. A mosquito iridescent virus (MIV) from *Aedes taeniorhynchus* (Wiedemann). *Journal of Invertebrate Pathology* 7(4): 519-521.

Clements, A. N., 1992. The biology of mosquitoes, Development, Nutrition and Reproduction (Vol. 1). Chapman and Hall. London.

Clements, A. N., 2012. The biology of mosquitoes, Transmission of viruses and interaction with bacteria (Vol. 3). Wallingford: CABI.

Darcy-Tripier, F., Nermut, M. V., Braunwald, J., Williams, L. D., 1984. The organization of frog virus 3 as revealed by freeze-etching. *Virology* 138(2): 287-299.

Darsie, R. F., 1985. Mosquitoes of Argentina. Part I and II. Keys for identification of adult females and fourth stage larvae in English and Spanish (Diptera, Culicidae). *Mosquito Systematics*. 17: 163-334.

D’Costa, S. M., Vigerust, D. J., Perales-Hull, M. R., Lodhi, S. A., Viravathana, P., Bilimoria, S. L., 2012. First complete and productive cell culture model for members of the genus Iridovirus. *Archives of virology* 157(11): 2171-2178.

Delhon, G., Tulman, E. R., Afonso, C. L., Lu, Z., Becnel, J. J., Moser, B. A., Kutish, G. F., Rock, D. L., 2006. Type 3 (Mosquito Iridescent Virus) genome of invertebrate iridescent virus. *Journal of Virology*. 80:8439–8449.

Dellapé, M. E., Marti, G. A., Tranchida, M. C. García, J. J., 2005. First record of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) Infected by the parasite *Ascogregarina culicis* (Ross) (Aplicomplexa: Lecudinidae) in Argentina. *Entomologia y Vectores* 12: 111-115.

Derksen, A. C. G., Granados, R. R., 1988. Alteration of a lepidopteran peritrophic membrane by baculovirus and enhancement of viral infection. *Virology* 167: 242-250.

Devauchelle, G., Stoltz, D. B., Darcy-Tripier, F., 1985. Comparative ultrastructure of *Iridoviridae*. En: *Iridoviridae*, Springer, Berlin Heidelberg, pp. 1-21.

Eaton, H. E., Metcalf, J., Penny, E., Tcherepanov, V., Upton, C., Brunetti, C. R., 2007. Comparative genomic analysis of the family *Iridoviridae*: re-annotating and defining the core set of iridovirus genes. *Virology journal* 4(1): 11.

Engelhard, E. K., Volkman, L., 1994. Developmental resistance in fourth instar *Trichoplusia ni* orally inoculated with *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 209:384-389.

Farajollahi, A., Fonseca, D. M., Kramer, L. D., Kilpatrick, A. M., 2011. "Bird biting" mosquitoes and human disease: a review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes in epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution* 11(7): 1577-1585.

Federici, B.A., 1985. Viral pathogens of mosquitoes larvae. *Bulletin of American Mosquito Control Association*. 6:62-74.

Federici, B. A., 1995. The future of microbial insecticides as vector control agents. *J. Journal of American Mosquito Control Association*. 11: 260-268.

Federici, B. A., 1997. Baculovirus pathogenesis. En: Miller, L.K. (Ed.), *The Baculoviruses*. Plenum Press, New York, pp. 141–166.

Floor, T. G., 2007. Biorational control of mosquitoes (Bulletin nº7). Supplement to the Journal of the Mosquito Control Asociation 23 (2).

Fukuda, T. 1971. *Per os* transmission of *Chilo* iridescent virus to mosquitoes. *Journal of Invertebrate Pathology* 18: 152-153.

Garcia, J. J., Becnel, J. J., 1994. Eight new species of microsporidia (Microspora) from Argentine mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 64(3): 243-252.

García, J. J. Camino, N. B., 1990. Primera cita para la Argentina de infecciones naturales en larvas de *Culex pipiens* (L.) (Diptera: Culicidae). *Neotrópica* 36:83-86

Gerberg, E. J., Barnard, D. R., Ward, R. A., 1994. Manual for mosquito rearing and experimental techniques. American Mosquito Control Association, Inc.

Granados, R. R., Williams, K. A., 1986. In vivo replication of Baculoviruses, En: R.R. Granados y B.A. Federici (ed.), *The biology of baculoviruses* Vol. 1, C.R.C. Press, Boca Raton Florida, pp.89-108.

Hall, D. W., Anthony, D. W., 1971. Pathology of a Mosquito Iridescent Virus (MIV) Infecting *Aedes taeniorhynchus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 18: 61-69.

Henderson, C. W., Johnson, C., Llodhi, S. A., Bilimoria, S. L., 2001. Replication of *Chilo iridescent virus* in the cotton boll weevil, *Anthonomus grandis*, and development of an infectivity assay. *Archives of Virology*, 146: 767-775.

Hernandez, A., Marina, C. F., Valle, J., Williams, T., 2005. Persistence of invertebrate iridescent virus 6 in tropical artificial aquatic environments. *Archives of Virology*.150: 2357–2363

Huang, Y., Li, S., Zhao, Q., Pei, G., An, X., Guo, X., Tong, Y., 2015. Isolation and characterization of a novel invertebrate iridovirus from adult *Anopheles minimus* (AMIV) in China. *Journal of invertebrate pathology* 127: 1-5.

Humeres, S. G., Almirón, W. R., Sabattini, M. S., Gardenal C. N., 1998. Estimation of genetic divergence and gene flow between *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Argentina. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 93: 57-62.

Jacques, R. P., 1985. Stability of insect viruses in the environment. En: Maramorosch, K. y Sherman, K. E. (eds.), *Viral insecticides for biological control*, Academic Press, New York. pp: 285-360.

Jehle, J. A., Blissard, G. W., Bonning, B. C., Cory, J. S., Herniou, E., Rohrmann, G. F., Theilmann, D. A., Thiem, S. M., Vlak, J. M., 2006. On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Archives of virology* 151: 1257–1266.

Jenkins, D. W., 1964. Pathogens, parasites and predators of medically important arthropods. Suppl. Vol. 30, *Bulletin World Health Organization*, 150 pp.

King, A. M., Adams, M. J., Carstens, E. B., Lefkowitz, E. J., 2012. *Virus Taxonomy* 9th report. Elsevier. ISBN: 978-0-12-384684-6.

Kirkpatrick, B. A., Washburn, J. O., Engelhard, E. K., Volkman, L. E., 1994. Primary infection of insect tracheae by *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 203: 184-186.

Knight, K. L., Stone, A., 1977. A catalog of the Mosquitoes of the World (Diptera: Culicidae) (2nd ed.). Vol. VI. Entomological Society of America's., College Park.

López Lastra, C.C., Garcia, J.J., Reboredo, G., 1992. Efecto comparativo de la virulencia de los hongos *Aphanocladium album* (Preuss) Gams y *Tolypocladium cylindrosporum* Gams (Deuteromycotina: Hyphomycetes) contra larvas de mosquito (Diptera: Culicidae). *Boletín Micológico*. 7(1-2): 13-16.

Linley, J. R., Nielsen, H. T., 1968.a. Transmission of a Mosquito Iridescent Virus in *Aedes taeniorhynchus* I. Laboratory Experiments. *Journal of Invertebrate Pathology* 12: 7-16.

Linley, J. R. y Nielsen H. T. 1968 b. Transmission of a mosquito iridescent virus in *Aedes taeniorhynchus*. II Experiments related to transmission in nature. *Journal of Invertebrate Pathology* 12: 17-24.

López, M., Rojas, J. C., Vandame, R., Williams, T., 2002. Parasitoid-mediated transmission of an iridescent virus. *Journal of Invertebrate Pathology* 80: 160-170.

Marina, C. F., Arredondo-Jiménez, J. I., Castillo A. y Williams T., 1999. Sublethal effects of iridovirus disease in a mosquito. *Oecologia*. 119: 383-388.

Marina, C. F., Feliciano, J. M., Valle, J., Williams, T., 2000. Effect of temperature, pH, ion concentration, and chloroform treatment on the stability of invertebrate iridescent virus 6. *Journal of Invertebrate Pathology* 75: 91–94.

Marina, C. F., Arredondo-Jiménez, J. I., Ibarra, J. E., Fernandez-Salas, I., Williams, T., 2003. Effects of fan optical brightener and an abrasive on iridescent virus infection and development of *Aedes aegypti*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 109: 155-161.

Marti, G. A., Micieli, M. V., Scorsetti, A. C., Liljesthrön, G., 2004. Evaluation of *Mesocyclops annulatus* (Copepoda: Cyclopidae) as Control Agent of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 99 (5): 535-540.

Matta, J.F., y Lowe, R.E., 1970. The Characterization of a Mosquito Iridescent Virus (MIV). I. Biological Characteristics, Infectivity, and Pathology. *Journal of Invertebrate Pathology*. 16: 38-41.

Micieli, M. V. y García, J. J., 1997. Parasitismo por microsporidios (Microspora) en tres especies de mosquitos (Diptera: Culicidae) de la Argentina. *Revista de Biología Tropical* 44:635-639.

Micieli, M. V., García, J. J., 1999. Estudios epizootiológicos de *Strelkovimermis spiculatus* Poinar y Camino, 1986 (Nematoda, Mermithidae) en una población natural de *Aedes albifasciatus* Macquart (Diptera, Culicidae) en la Argentina. *Miscel·lània Zoològica* 22(2): 31-37.

Micieli, M. V., García, J. J., Becnel, J. J., 2000a. Horizontal Transmission of *Amblyospora albifasciati* García and Becnel, 1994 (Microsporidia: Amblyosporidae), to a Copepod Intermediate Host and the Neotropical Mosquito, *Aedes albifasciatus* (Macquart, 1837). *Journal of invertebrate pathology* 75(1): 76-83.

Micieli, M. V., García, J. J., Becnel, J.J., 2000b. Life cycle and description of *Amblyospora camposi* N. sp. (Microsporidia: Amblyosporidae) in the mosquito *Culex renatoi* (Diptera: Culicidae) and the copepod *Paracyclops fimbriatus* (Copepoda: Cyclopidae). *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 47: 575-580.

Micieli, M. V., Marti, G., García, J. J., 2002. Laboratory evaluation of *Mesocyclops annulatus* (Wierzejski, 1892) (Copepoda: Cyclopoidea) as a predator of container-breeding mosquitoes in Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97(6): 835-838.

Micieli, M V , Risso, P., Achinelly, M. F., Villar, M. M., Muttis, M., 2012. Population dynamics between the mermithid *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda: Mermithidae) and the floodwater mosquito *Ochlerotatus albifasciatus* (Diptera: Culicidae) over time. *Biological Control* 61(1):55–63.

Micieli, M. V., Matacchiero, A. C., Muttis, E., Fonseca, D. M., Aliota, M. T., Kramer, L. D., 2013. Vector competence of Argentine mosquitoes (Diptera: Culicidae) for West Nile virus (Flaviviridae: Flavivirus). *Journal of medical entomology* 50(4): 853-862.

Monath, T. P., Sabattini, M. S., Pauli, R., Daffner, J. F., Mitchell, C. J., Bowen, G. S., Cropp, C. B., 1985. Arbovirus investigation in Argentina, 1977-1980. IV. Serologic Surveys and Sentinel Equine Program. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 34(5): 966-975.

Moser, B. A., Becnel, J. J., White, S. E., Afonso, C., Kutish, G., Shanker, S., Almira, E., 2001. Morphological and molecular evidence that *Culex nigripalpus* baculovirus is an unusual member of the family *Baculoviridae*. *Journal of General Virology* 82(2): 283-297.

Mullens, B. A., Velten, R. K. and Federichi, B. A., 1999. Iridescent virus Infection in *Culicoides variipennis sonoriensis* and Interaction with the Mermithid Parasite *Heleidomermis magnapapula*. *Journal of Invertebrate Pathology* 73: 231-233.

Muttis, E., Miele, S. A. B., Ghiringhelli, P. D., Belaich, M. N., Micieli, M. V., Becnel, J. J., García, J. J., 2012. First record of a mosquito iridescent virus in *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). *Archives of Virology* 157 (8): 1569-1571.

Muttis, E., Micieli, M. V., García, J. J., 2013. *Culex pipiens* affected by joint infection of a mosquito iridescent virus and *Strelkovimermis spiculatus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 114: 295-297.

Nota descriptiva N° 387, febrero 2016. Enfermedades transmitidas por vectores. Organización Mundial de la Salud. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs387/es/>

Nota informativa N° 100, junio 2016. Fiebre amarilla. Organización Mundial de la Salud. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/es/>

Ohba, M., Aizawa, K., 1979. Multiplication of Chilo iridescent virus in noninsect arthropods. *Journal of Invertebrate Pathology* 33(3): 278-283.

Pelizza, S.A., López Lastra, C.C., Bizarro, V., Becnel, J.J., García, J.J., 2007. Biotic and abiotic factors affecting *Leptolegnia chapmanii* infections in *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Journal of American Mosquito Control Association*. 23(2): 177-181.

- Poinar, G. O., Roberta, T. H., Petersen, J. J., 1979.** Immune Responses of Mosquitoes against *Romanomermis culicivorax* (Mermithida: Nematoda). *Journal of Nematology* 11 (1): 110-116.
- Poinar, G. O., Hess, R. T., Cole, A., 1980.** Replication of an Iridovirus in a Nematode (Mermithidae). *Intervirology* 14: 316-320.
- Poinar, G. O. Jr., Camino, N. B., 1986.** *Strelkovimermis spiculatus* n. sp. (Mermithidae: Nematodo) parasiting *Aedes albifasciatus* Mac. (Culicidae: Diptera) in Argentina. *Journal of Nematology* 18: 317-319.
- Rahman, M. M.; Gopinathan, K. P., 2004.** Systemic and in vitro infection process of *Bombix mori nucleopolyhedrovirus*. *Virus Research* 101: 109-118.
- Reyes, A., Christian, P., Valle, J, Williams, T., 2004.** Persistence of Invertebrate Iridescent virus in soil. *BioControl*. 49:433-440.
- Roberts, D. W., Strand, M. A., 1977.** Pathogens of medically important arthropods. Suppl. N° 1 To Vol. 55, *Bulletin world health organization* pp. 419.
- Roberts, D. W., Castillo, J. M., 1980.** Bibliography on pathogens of medically important arthropods. Suppl. To Vol. 58, *Bulletin World Health Organization* pp 197.
- Rossi, G. C., Pascual, N. T., Krsticevic, F. J., 1999.** First record of *Aedes albopictus* (Skuse) from Argentina. *Journal of American Mosquito Control Association* 15: 422-422.
- Rueda Páramo, M. E., López Lastra, C. C., & García, J. J., 2015.** Persistence and pathogenicity of a native isolate of *Leptolegnia chapmanii* against *Aedes aegypti* larvae in different anthropic environments. *Biocontrol Science and Technology* 25(2): 238-243.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., 1989.** Molecular cloning: a laboratory manual Second Editioin. Cold spring harbor laboratory press, New York.
- Sciocco-Cap, A., 2001.** Biología y pathogenesis de los baculovirus, En: Caballero, P., López Ferber, M., Williams, T. (eds.). Los Baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Pp 47-72.
- Shapiro, A. M., Becnel, J. J., White, S. E., 2004.** A nucleopolyhedrovirus from *Uranotaenia sapphiina* (Diptera: Culicidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 86, 96-103.
- Smith, J. L., Fonseca, D. M., 2004.** Rapid assays for identification of members of the *Culex (Culex) pipiens* complex, their hybrids, and other sibling species (Diptera: Culicidae). *American journal of tropical medicine and hygiene* 70(4): 339-345.

- Stoltz, D.B., Summers, M.D.**, 1971. Pathway of infection of mosquito iridescent virus. *Journal of Virology* 8(6): 900-909.
- Stoltz, D. B., Pavan, C., Cunha, A. B. D.**, 1973. Nuclear polyhedrosis virus : a posible example of the novo intranuclear membrane morphogenesis. *Journal of General Virology*. 19: 145-150.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S.**, 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. doi:10.1093/molbev/msm092.
- Tesh, R. B., Andreadis, T. G.**, 1992. Infectivity and pathogenesis of iridescent virus type 22 in various insect hosts. *Archives of Virology*. 126:57-65.
- Thompson, J. D., Gibson, T., Higgins, D. G.**, 2002. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Current protocols in bioinformatics* 2-3.
- Tranchida, M. C., Riccillo, P. M., Micieli, M. V., García, J. J., Rodriguero, M. S.**, 2011. Isolation, characterization and evaluation of mosquitocidal activity of *Lysinibacillus* strains obtained from *Culex pipiens* larvae. *Annals of microbiology* 61(3):575-584.
- Tranchida, M. C., Riccillo, P. M., Rodriguero, M. S., García, J. J., Micieli, M. V.**, 2012. Isolation and identification of α -proteobacteria from *Culex pipiens* (Diptera Culicidae) larvae. *Journal of invertebrate pathology* 109(1): 143-147.
- Thomas, D. D., Donnelly, C. A., Wood, R. J, Alphey, L. S.**, 2000. Insect population control using a dominable, repressible, dominat, lethal genetic system. *Science* 87(5462): 2474-2476.
- Undeen, A.H., Fukuda, T.**, 1994. Effect of host resistance and injury on the susceptibility of *Aedes taeniorhynchus* to mosquito iridescent virus. *Journal of American Mosquito Control Association*. 10(1): 64-66.
- Vega, F. E., Kaya, H. K.**, 2012. Insect Patology. Segunda edición. Academic Press,San Diego.
- Vezzani, D., Wisnivesky, C.**, 2006. Prevalence and seasonality of *Ascogregarina culicis* (Apicomplexa: Lecudinidae) in natural populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from temperate Argentina. *Journal of invertebrate pathology* 91(3): 183-187.
- Vezzani, D., Carbajo, A. E.**, 2008. *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and dengue in Argentina: current knowledge and future directions. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 103(1): 66-74.

Vinogradova, E. B., 2000. *Culex pipiens pipiens* mosquitoes: taxonomy, distribution, ecology, physiology, genetics, applied importance and control (No. 2). Pensoft Publishers. Moscú.

Vinogradova, E. B., 2003. Ecophysiological and morphological variations in mosquitoes of the *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae). *Acta Soc. Zool. Bohem.* 67:41-50.

Volkman, L. E., 1997. Nucleopolyhedrovirus interactions with their insect hosts. *Advances in virus research* 48: 313-348.

Washburn, J. O., Kirkpatrick, B. A., Volkman, L. E., 1995. Comparative pathogenesis of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus in larvae of *Trichoplusia ni* and *Heliothis virescens*. *Virology* 209: 561-568.

Weeb, S. R, Paschke, J. D., Wagner, G. W., Campbell, W. R., 1974. Infection of *Aedes aegypti* cells with mosquito Iridescent virus. *Journal of invertebrate pathology.* 23: 255-258.

Webb, S. R., Paschke, J. D., Wagner, G. W., Campbell, W. R., 1976. Pathology of Mosquito Iridescent Virus of *Aedes taeniorhynchus* in Cell Cultures of *Aedes aegypti*. *Journal of invertebrate pathology* 27: 27-40.

Williams, T., 1993. Covert iridovirus infection of blackfly larvae. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 251: 225-230.

Williams, T., Barbosa-Solomieu, V., & Chinchar, V. G., 2005. A decade of advances in iridovirus research. *Advances in virus research* 65: 173-248.

Williams, T., Hernández, O., 2006. Costs of cannibalism in the presence of an iridovirus pathogen of *Spodoptera frugiperda*. *Ecological Entomology* 31(2): 106-113.

Williams, T., 2008. Natural Invertebrate Host of Iridoviruses (Iridoviridae). *Neotropical Entomology.* 37 (6): 615-632.

Wood, H. A., Munkenberck, T. K., Vid, T. R., Hughes, P. R., 1993. Per os infectivity of preoccluded virions from polyhedron-minus recombinant baculoviruses. *Journal of invertebrate pathology.* 62: 64-67.

Woodard, D. B. y Chapman, H. C., 1968. Laboratory studies with the Mosquito Iridescent Virus (MIV). *Journal of invertebrate pathology* 11: 296-301.